

Rekombinante Herstellung und Charakterisierung der Eierstielproteine aus *Chrysoperla carnea*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
in der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und
Naturwissenschaften (BayNAT)
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Martin Neuenfeldt

aus *Bückeburg*

Bayreuth, 2019

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von September 2011 bis Dezember 2017 in Bayreuth am Lehrstuhl Biomaterialien, Fakultät für Ingenieurwissenschaften, Universität Bayreuth, unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Thomas Scheibel angefertigt. Die schriftliche Anfertigung der vorliegenden Arbeit erfolgte mit Unterbrechungen in der Zeit von Januar 2018 bis Februar 2019.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 06.03.2019

Zulassung durch das Leitungsgremium: 19.03.2019

Wissenschaftliches Kolloquium: 17.05.2019

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Dirk Schüler

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Thomas Scheibel	(Gutachter)
Prof. Dr. Andreas Möglich	(Gutachter)
Prof. Dr. Hans-Werner Schmidt	(Vorsitz)
Prof. Dr. Birte Höcker	

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Zusammenfassung	3
Summary.....	5
1 Einleitung.....	7
1.1 Seiden	7
1.1.1 Molekulare Struktur von Seide	7
1.1.2 Insektenseiden	10
1.1.2.1 Historie der menschlichen Nutzung von Insektenseide	10
1.1.2.2 Biologische Diversität von Insektenseide	11
1.1.2.3 Florfliegen-seide	12
1.1.2.3.1 Die Seide des Eierstiels	13
1.2 Rekombinante Herstellung von Seidenproteinen	17
1.3 Assemblierung von Seidenproteinen zu Fasern	20
1.3.1 Thermodynamische Grundlagen der Selbstassemblierung von Makromolekülen	20
1.3.1.1 Die Flory-Huggins-Theorie.....	21
1.3.1.2 Phasentrennung	24
1.3.1.3 Blockcopolymere	27
1.3.2 Natürliche Spinnprozesse von Insektenseide	28
1.3.2.1 Der natürliche Spinnprozess der Florfliege.....	30
1.3.3 Elektrisches Verspinnen von Seide	30
1.3.3.1 Grobe Übersicht über mögliche Verarbeitungsprozesse von Seide	30
1.3.3.2 Herstellung von Vliesstoffen mittels Elektrospleinnverfahren	31
1.3.4 Seidenmaterialien in der Anwendung.....	33
1.3.4.1 Überblick über Einsatzmöglichkeiten von Seidenmaterialien.....	33
1.3.4.2 Einsatzmöglichkeiten von elektroversponnenen Seidenvliesstoffen.....	34
2 Zielsetzung	35
3 Synopsis.....	37
3.1 Molekularbiologische Studien.....	37
3.2 Biotechnologische Herstellung von Seidenproteinen der Florfliege	39

3.3	Studien über Eigenschaften der Selbstassemblierung von ChryC1, ChryC2 und ChryC3	40
3.4	Verarbeitungen von Seidenproteinen zu Vliesstoffen	42
3.4.1	Herstellung von elektroversponnenen Fasern	42
3.4.2	Seidenbasierte Vliesstoffe als Filtermaterial	44
4	Literaturverzeichnis	47
5	Publikationsliste	55
6	Darstellung des Eigenanteils	56
7	Teilarbeiten	57
7.1	Teilarbeit I	57
7.2	Teilarbeit II	81
7.2	Teilarbeit III	94
	Danksagung	120
	(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen	121

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
bp	Basenpaar
ca.	circa
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
cm	Zentimeter
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i>
FSD	<i>Fourier self deconvolution</i>
FTIR	Fourier Transform Infrarot
HFA	Hexafluoracetone
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
IEP	Isoelektrischer Punkt
J	Joule
K	Kelvin
kB	Boltzmann Konstante ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)
kDa	Kilo-Dalton (1000 Dalton)
L	Liter
LCST	<i>lower critical solution temperature</i>
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
n.b.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
Pa	Pascal
R	Gaskonstante ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

r. L.	relative Luftfeuchte
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT-qPCR	<i>reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
spec.	Species
T	Temperatur
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i>
UCST	<i>upper critical solution temperature</i>

Die Angabe von Aminosäuren erfolgt in dieser Arbeit gemäß der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) Ein-Buchstabennomenklatur.

Zusammenfassung

Obwohl die Herstellung von Seide der Seidenspinnerraupe *Bombyx mori* seit einigen tausend Jahren vom Menschen kontrolliert wird, hat erst die in den vergangenen Jahrzehnten entwickelten biotechnologischen Methoden den technischen Zugang zu Seiden vieler anderer Organismen ermöglicht. Neben ihrem ästhetischen Erscheinungsbild stehen Seidenmaterialien auch aufgrund ihrer mechanischen und biomedizinischen Eigenschaften im Fokus des Interesses.

In der vorliegenden Dissertation wurde das Seidensystem der europäischen Florfliege *Chrysoperla carnea* untersucht. Weibliche Florfliegen produzieren sogenannte Eierstiele, an deren Enden sie jeweils ein Ei anheften. Es ist bereits bekannt, dass die in diesen Fasern enthaltenen Seidenproteine vorwiegend in einer *cross*-beta Konformation vorliegen. Diese strukturelle Eigenschaft wird als hauptverantwortlich für die Biegesteifigkeit der Seidenfaser angesehen.

Mittels einer Transkriptomanalyse wurden drei Gene identifiziert, welche jeweils für ein Seidenprotein kodieren. Diese drei Seidenproteine sind reich an Glycin-, Alanin- und Serinresten und wurden ChryC1, ChryC2 bzw. ChryC3 genannt. ChryC1 enthält zwei repetitive Kerndomänen, welche von zwei kleineren terminalen Domänen flankiert sind. ChryC2 und ChryC3 enthalten jeweils nur eine repetitive Kerndomäne. Der repetitive Charakter aller Kerndomänen zeichnet sich durch eine strikte Periodizität von 18 Aminosäureresten aus.

Mittels einer quantitativen Analyse der Genexpression wurde gezeigt, dass in der Spinndrüse über 80 Molprozent der Seidenproteine von ChryC1 repräsentiert werden. Für die Genexpression von ChryC1 zu ChryC2 wurde ein Verhältnis von ca. 5,5:1 ermittelt. Alle drei natürlichen Gensequenzen wurden anschließend einem bakteriellen Expressionssystem zugeführt.

Für die biotechnologische Herstellung aller drei Seidenproteine musste eine Fermentationsstrategie etabliert werden, welche die Seidenproteine vor zellulären Abbaureaktionen schützt. Hierfür erwiesen sich Fermentationen, bei denen die Induktion der Genexpression bei niedrigeren Zelldichten durchgeführt wurde, als besonders geeignet. Für die nachfolgende Aufarbeitung wurde für alle drei Proteine eine sequentielle selektive Fällungsstrategie etabliert. ChryC1 und ChryC3 wurden jeweils mittels aufeinanderfolgender Behandlung mit Hitze, Essigsäure und kosmotropen Salzen von den bakteriellen Proteinen abgetrennt. ChryC2 erwies sich zwar ebenfalls als hitze- und säurebeständig, es präzipitierte jedoch nicht in Gegenwart kosmotroper Salze. Stattdessen wurde zunächst dieses Seidenprotein zusammen mit bakteriellen Proteinrückständen durch Zugabe organischer Lösungsmittel gefällt und aus dem resultierenden Präzipitat mittels eines wässrigen Puffers selektiv resolubilisiert.

Zum Verständnis der molekularen Grundlagen des natürlichen Spinnprozesses wurden anschließend die drei Seidenproteine auf ihre Selbstassemblierungseigenschaften untersucht. Für alle drei Proteine konnte gezeigt werden, dass sie in wässriger Lösung vorwiegend *random coil* Strukturen enthalten. Durch Zugabe von Ethanol konnten jeweils beta-Faltblattstrukturen induziert werden. Für ChryC3 stellte dies der einzige Selbstassemblierungsprozess dar, der in dieser Arbeit beobachtet wurde.

ChryC1 wies als einziges Seidenprotein eine untere kritische Lösungstemperatur von 27,3°C auf; oberhalb dieser Temperatur wurde eine Mikrophasenseparation der Proteinlösung beobachtet. Aus konzentrierten Lösungen von ChryC1 heraus konnte außerdem die Formation von gleichmäßigen Filmstrukturen beobachtet werden, in diesen nativen Filmen (ohne Nachbehandlung) wurde ein Anteil von knapp 50% an beta-Faltblattstrukturen nachgewiesen. Lösungen von ChryC2 reagierten hingegen spontan zu Hydrogelen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass diese Hydrogele Nanofibrillen mit einem mittleren Durchmesser von 5 nm enthielten. Diese Fibrillen wiesen vorwiegend beta-Faltblattstrukturen auf.

Im zweiten Teil der Dissertation wurde ChryC1 zu Nanovliesstoffen elektroversponnen. Über den Parameter der eingesetzten Proteinkonzentration konnte der durchschnittliche Faserdurchmesser der resultierenden Vliesstoffe beeinflusst werden. Um die Beständigkeit gegenüber Umwelteinflüssen zu erhöhen, wurden die versponnenen Vliesstoffe mittels Wasserdampf nachbehandelt. Spektroskopische Messungen ergaben, dass diese Nachbehandlung im erheblichen Umfang beta-Faltblattstrukturen in den Fasern induzierte. Nachfolgend wurden Vliesstoffe unterschiedlicher Belegungsdichten einem Filtertest zugeführt, um ihre Eignung zur Filtrierung von Feinstaub zu evaluieren. Als Vergleich wurde dieser Filtertest auch mit elektroversponnenen Nanovliesstoffen aus dem rekombinant hergestellten Spinnenseidenprotein e(ADF4)C16 sowie aus Polylaktid bzw. Polyethylenglycol durchgeführt. Mit dem Filtertest wurde gezeigt, dass bei höheren Belegungsdichten Vliesstoffe aus ChryC1 und aus eADF4(C16) ähnliche Abscheidungsraten an Feinstaubpartikeln aufwiesen, diese Filterleistung ging bei Vliesstoffen aus ChryC1 jedoch mit einem geringeren Druckabfall einher.

Insgesamt stellen die Studien über die Selbstassemblierungseigenschaften von Seidenproteinen der Florfliege einen weiteren Baustein zum besseren Verständnis des natürlichen Spinnprozesses dar. Diese Erkenntnisse können zum Ziel beitragen, langfristig diesen Spinnprozess *in vitro* nachahmen zu können. Mit der Herstellung von Vliesstoffen aus ChryC1 wurde zudem eine vielversprechende Morphologie für technische Anwendungsmöglichkeiten vorgestellt.

Summary

Mankind has been manufacturing silkworm silk (*Bombyx mori*) for several thousand years. However, the technical access to many other silk systems was only made possible due to biotechnological methods, which has been developed within the last decades. Besides their aesthetic appearance, silk has been in the focus of interest due to their unique mechanical and biomedical properties.

This dissertation describes the silk system of the European lacewing *Chrysoperla carnea*. Female lacewings produce so-called egg stalks to which they attach a single egg per stalk. The silk proteins contained in these fibres predominantly comprise cross-beta conformation, as described in the literature. This structural property is considered responsible for the high bending stiffness of the resulting fibre.

In this work, three genes were identified, each encoding for a silk protein. These three silk proteins are rich in glycine, alanine and serine residues and were named ChryC1, ChryC2 and ChryC3, respectively. ChryC1 comprises two repetitive core domains, which are flanked by two short terminal domains. For ChryC2 and ChryC3, respectively, only one repetitive core domain is present. The repetitive character of all core domains is featured by a strict periodicity of 18 amino acid residues.

It was shown that ChryC1 represents more than 80 mole percent of silk proteins expressed in the silk gland. Furthermore, a ratio of 5.5 to 1 was measured for the gene expression of ChryC1 and ChryC2. Subsequently, all three natural gene sequences were introduced to a bacterial expression system.

For the recombinant production of all three silk proteins, a fermentation strategy was established which prevented the produced silk proteins from cellular degradation. For this, induction of gene expression at lower cell densities was shown to be the most feasible strategy. For subsequent protein purification, all three silk proteins could be isolated by a sequential selective precipitation strategy. In detail, ChryC1 and ChryC3 could be isolated due to their stability towards heat, acetic acid and certain concentrations of cosmotropic salts. In contrast, ChryC2 did not show any precipitation tendency in the presence of cosmotropic salts. Therefore, ChryC2 and remaining bacterial proteins were precipitated by adding organic solvents and only the silk protein was subsequently resolubilized with an appropriate aqueous buffer.

For a better understanding of the molecular principles which underly the natural spinning process, the self-assembly properties of the isolated silk proteins were analysed. It was shown

for all three proteins that a random coil structure was predominant in aqueous solution. The secondary structure could be shifted towards beta-sheets by adding ethanol. For ChryC3, this represents the only self-assembly property observed during this study.

For ChryC1, a lower critical solution temperature of 27.3°C was determined. Above this temperature, a microphase separation of the solution was observed. Additionally, the formation of smooth film structures was observed out of concentrated solutions of ChryC1. These native films (without any subsequent treatment) comprised nearly 50% of beta-sheet structure. In contrast, solutions of ChryC2 were prone to gelation. Electron microscopic studies revealed nanofibrils with a mean diameter of 5 nm as underlying structure of this morphology. These fibrils predominantly comprised beta-sheet content.

In the second part of this dissertation, ChryC1 was electrospun into nonwovens. The mean fibre diameter of these fabricated meshes was controlled by the chosen protein concentration. In order to stabilise the resulting nonwoven mats, a posttreatment with water vapour was conducted. Spectroscopic analysis showed a significant increase in beta-sheet content in these nanofibers induced by this treatment. Subsequently, nonwovens with varying layer thickness were transferred to a filter test by which the suitability of these nonwovens for filtering fine dust particles was evaluated. For comparison, this filter test also included electrospun nonwovens out of the recombinant spider silk protein e(ADF4)C16 as well as nonwovens out of poly(lactid acid) and poly(ethylene oxide), respectively. It was shown in this filter test that nonwovens out of ChryC1 and e(ADF4)C16 shared similar deposition rates of fine dust particles when these nonwovens featured a higher layer thickness. However, the filtration efficiency of these ChryC1 nonwovens was accompanied by a lower pressure drop compared to the respective e(ADF4)C16 nonwovens.

In conclusion, the self-assembly studies of lacewing silk proteins might pave the way towards a better understanding of the natural spinning process. In the long term, these findings might also contribute to the objective of being able to mimic the natural spinning process *in vitro*. Additionally, nonwovens out of ChryC1 appear to be a promising morphology for technical applications.

1 Einleitung

1.1 Seiden

Jedes Seidensystem besteht aus sezernierten Strukturproteinen, welche aus hochkonzentrierter Lösung heraus zu Fasern verarbeitet werden (Craig 1997). Die konzentrierten Seidenproteinlösungen werden stets in Drüsen gespeichert, die sehr häufig in einen Spinnapparat münden. Der kontrollierte Phasenübergang wird in jedem Seidensystem durch Scherkräfte induziert (Jin und Kaplan 2003; Weisman, Okada *et al.* 2009). Die während des Spinnprozesses auftretenden Scherkräfte resultieren stets aus einer auf die Seidenlösung wirkende Zugkraft; Seidenlösungen werden also nicht extrudiert.

Seidensysteme wurden bisher ausschließlich im Stamm der Arthropoden gefunden. Die Fasern des Muschelbyssus, auch Muschelseide genannt, welcher von einigen Mollusken produziert wird, stellen im eigentlichen Sinne keine Seide dar, da sie mehrheitlich Kollagen enthalten, welches grundsätzlich nicht als Seidenmaterial gilt (Qin, Coyne *et al.* 1997). Der Muschelbyssus verkörpert zudem ein Gradientenmaterial, welches mithilfe mehrerer spezialisierter Drüsen sezerniert wird (Priemel, Degtyar *et al.* 2017).

Phylogenetische Studien legen nahe, dass sich Seide mehrfach unabhängig voneinander evolutionär entwickelt hat; allein für die Klasse der Insekten wurden 23 eigenständige Seidengruppen postuliert (Sutherland, Young *et al.* 2010). Die These der mehrfachen evolutionären Entwicklung von Seide wird außerdem unterstützt durch die Tatsache, dass Seide aus unterschiedlichen Drüsentypen heraus versponnen werden kann, namentlich aus Labialdrüsen, Malpighischen Gefäßen oder Hautdrüsen (Sehnal und Akai 1990).

Grundsätzlich sind neben terrestrischen Seidensystemen auch aquatische Systeme bekannt, wie z.B. die Seide der Köcherfliegenlarven oder die marine Seide der Flohkrebse (Stewart und Wang 2010; Kronenberger, Dicko *et al.* 2012). Die natürlichen Verwendungszwecke von Seide sind höchst heterogen: Seide wird während der Paarung, zum Schutz des Nachwuchses, für Kokons, zur Jagd oder auch als Baumaterial für Unterschlupf verwendet (Sutherland, Young *et al.* 2010).

1.1.1 Molekulare Struktur von Seide

Alle bekannten Seidenproteine weisen eine charakteristische Proteindomänenarchitektur auf, welche Kerndomänen mit repetitiven Sequenzbereichen beinhaltet, die von nichtrepetitiven terminalen Domänen flankiert sind (Heim, Römer *et al.* 2010). Die repetitiven Sequenzmotive

bestehen typischerweise aus 10-50 Aminosäureresten. Seidenproteine enthalten hohe Anteile an amphiphilen Aminosäureresten in ihrer Primärstruktur (namentlich Glycin-, Serin- und Alaninreste), welche einerseits eine ausreichende Löslichkeit der Seidenproteine in der Drüse gewährleisten, andererseits sind diese Aminosäurenreste mitverantwortlich für die Unlöslichkeit der resultierenden Seidenfaser (Sutherland, Young *et al.* 2010).

Seide zeichnet sich durch ihren semikristallinen Charakter aus, bei der Kristallitstrukturen in amorphe Bereiche eingebettet sind. In Seidenkristalliten wurden fünf verschiedene geordnete Strukturen identifiziert (Abbildung 1): *Coiled coil*, beta-Faltblätter, *cross*-beta-Strukturen, Kollagentripelhelices sowie hexagonale Strukturen bestehend aus Polyglycin II Helices (Sutherland, Young *et al.* 2010). Im Laufe der Evolution entstanden verschiedene repetitive Aminosäuresequenzmotive, welche sich zu den oben genannten Strukturen anordnen können: Für *coiled coil* Strukturen ist die Heptadwiederholung hpphppp notwendige Voraussetzung, bei der h und p hydrophobe bzw. polare Aminosäurereste repräsentieren.

Beta-Faltblätter werden typischerweise von Wiederholungen amphiphiler Aminosäureresten gebildet, wie etwa vom GAGAGS-Motiv in der Seide der Seidenspinnerraupe. Sind beta-Faltblätter einer Polypeptidkette durch beta-Schleifen miteinander verbunden, ergeben sich *cross*-beta-Strukturen, bei der die beta-Faltblätter im rechten Winkel zur Faserachse ausgerichtet sind. Die Existenz von funktionalen *cross*-beta-Systemen mag überraschen, da diese Strukturen auch stark mit neurodegenerativen Krankheitsbildern assoziiert sind, in denen entsprechende Proteine für die Bildung von Amyloiden verantwortlich sind (Kirkitaдзе, Condrón *et al.* 2001). Wahrscheinlich ist das Potential zur unkontrollierten Aggregation, welches entsprechenden Seidensystemen innewohnt, der Grund für ihre Seltenheit (Weisman, Okada *et al.* 2009).

GX₁X₂-Wiederholungen bilden linksgängige Helices aus (mit Prolinresten als häufigste Aminosäure an Position X₁), die wiederum zu Tripelhelices assemblieren, wie sie z.B. in Kollagen zu finden sind. Wie bereits erwähnt, ist Kollagen selbst nicht als Seidenmaterial definiert. Es wurden jedoch einige Seiden identifiziert, welche kollagenähnliche helikale Strukturen als molekulares Charakteristikum aufweisen, so z.B. die Seide der Pflanzenwespen (Sehnal und Sutherland 2008). Aus diesem Grund sind Seiden mit kollagenartigen Strukturen als eigene Seidengruppe definiert. GGX₂-Wiederholungen führen hingegen zur Bildung von rechtsgängigen Polyglycin II Helices, welche eine ₃₁-Helixsymmetrie besitzen. Diese Helices ordnen sich in paralleler Ausrichtung zu hexagonalen Strukturen an (Crick und Rich 1955).

Der Anteil an Kristallitstrukturen kann zwischen verschiedenen Seidensystemen stark schwanken, außerdem ist das Verhältnis von kristallinen zu amorphen Bereichen maßgeblich bestimmend für die mechanischen Eigenschaften einer Seide (Heidebrecht und Scheibel 2013;

Lintz und Scheibel 2013): Grundsätzlich sind in kristallinen Bereichen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Amidgruppen verantwortlich für die Fähigkeit von Seide, Zugkräften zu widerstehen, welches sich in einer erhöhten Festigkeit des Materials manifestiert (Porter und Vollrath 2009). Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Hydratation tragen ungeordnete Proteinbereiche (*random coil*) dazu bei, dass Seiden auch Eigenschaften eines Elastomers aufweisen können (Porter und Vollrath 2008). Die Kombination aus Festigkeit und Dehnbarkeit, welche aus dem gleichzeitigen Vorhandensein von kristallinen Strukturen und *random coil* Bereichen resultiert, kann zu Seidensystemen mit außergewöhnlich hoher Zähigkeit führen (Tabelle 1).

Grundsätzlich ist die Korrelation zwischen Seidenstruktur und Funktion sehr schwach ausgeprägt: Eine bestimmte geordnete Proteinstruktur ist keine notwendige Bedingung dafür, dass eine Seide ihren Verwendungszweck erfüllen kann. Veranschaulicht wird dieser Sachverhalt unter anderem durch die Tatsache, dass alle fünf Typen von geordneten Seidenproteinstrukturen in Kokons verschiedener Arthropodenspezies nachgewiesen werden konnte (Sutherland, Young *et al.* 2010).

Tabelle 1: Mechanische Eigenschaften ausgewählter Seiden im Vergleich zu synthetischen Polyamiden (Hepburn, Chandler *et al.* 1979; Bauer und Scheibel 2012; Heidebrecht und Scheibel 2013). r. L.: relative Luftfeuchte, n.b.: nicht bestimmt.

Material	Elastizitätsmodul [GPa]	Festigkeit [MPa]	Dehnbarkeit [%]	Zähigkeit [MJ/m ³]
<i>Chrysoperla carnea</i> Eierstiel (30% r. L.)	5,8	68	2	1,2
<i>Chrysoperla carnea</i> Eierstiel (70% r. L.)	3,2	155	210	87
<i>Bombyx mori</i> Kokon	7	600	18	70
<i>Apis mellifera</i> Kokon	n.b.	0,4	204	n.b.
<i>Araneus diadematus</i> Zugfaden	6	700	30	150
Nylon 6.6	5	950	18	80
Kevlar 49	130	3600	2,7	50

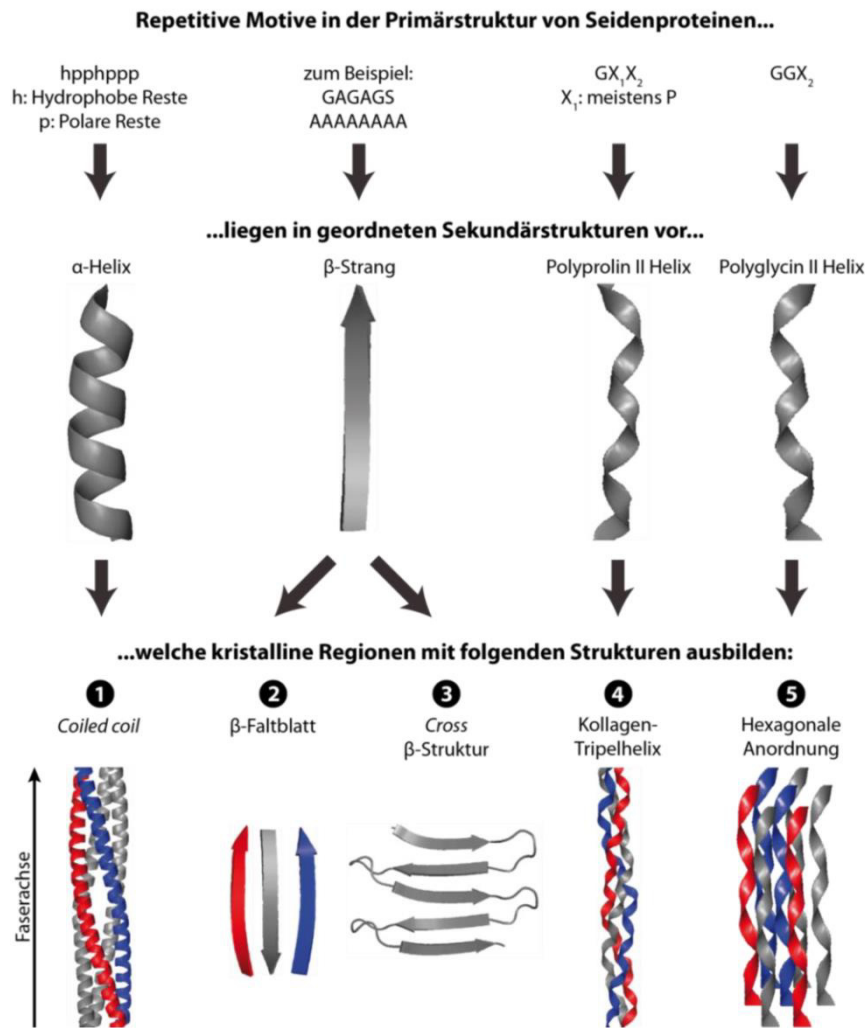


Abbildung 1: Die fünf Arten von geordneten Seidenstrukturen. Allen Strukturen ist gemein, dass ihnen repetitive Motive in der Primärstruktur zugrunde liegen. Alle Aminosäuren sind gemäß der IUPAC Ein-Buchstabennotenkatur angegeben. Modifiziert nach (Neuenfeldt und Scheibel 2014) mit freundlicher Genehmigung von CRC Press.

1.1.2 Insektenseiden

1.1.2.1 Historie der menschlichen Nutzung von Insektenseide

Die Seide der Seidenspinnerraupe *Bombyx mori* kann als prominenteste Insektenseide angesehen werden, welche in Form von Textilprodukten bereits in der Antike zwischen Asien und Europa gehandelt wurde. Historisch muss zwischen der Seidengewinnung aus wilden Seidenspinnerarten (wie z.B. aus Spezies der Gattung *Antheraea*) und der Seidenraupenzucht der domestizierten Art *B. mori* differenziert werden (Ball 2011): Die frühesten Zeugnisse menschlicher Nutzung von Wildseide wurden in China sowie in der Indus-Kultur (heutiges Pakistan) gefunden

und lassen sich jeweils auf ca. 2500 v. Chr. datieren (Good, Kenoyer *et al.* 2009). Somit herrscht streng genommen Unklarheit über die Frage, in welcher Kultur zuerst Seide als nutzbares Material erkannt wurde, wenngleich neueste Forschungen die Frage aufwerfen, ob in der chinesischen Provinz Henan bereits 6500 v. Chr. Wildseide ein Bestandteil bei der Totenbestattung darstellte (Gong, Li *et al.* 2016).

Die Tatsache, dass die Domestizierung der wilden Art *Bombyx mandarina* zu *B. mori*, inklusive der damit einhergehenden Entwicklung der Seidenmanufaktur, zuerst in China erfolgte, wird hingegen als Konsens angesehen (Ball 2011). Das Handwerk der Seidenweberei lässt sich bis in die Shang-Dynastie zurückverfolgen (1600-1045 v. Chr.), erste Domestizierungsversuche der Seidenspinnerraupe dürfte maximal 1000 Jahre vorher begonnen haben (Good, Kenoyer *et al.* 2009). Berichte, wonach in China die Verarbeitung von domestizierter *B. mori* Seide bereits 3000 v. Chr. vom Menschen kontrolliert wurde, können hingegen als Legenden angesehen werden (Goldsmith, Shimada *et al.* 2005).

Über die Seidenstraße und nachfolgendem innereuropäischen Handel gelangten Seidenprodukte auch in Gebiete nördlich der Alpen. Ursprünglich galt ein mutmaßlich mit Seide besticktes Tuch aus der keltischen Grabstätte Hohmichele (Altheim, Baden-Württemberg) aus dem 6. Jahrhundert v. Chr. als frühestes Zeugnis dieses Handels, eine erneute Analyse des Tuches konnte den Seidenbefund jedoch nicht bestätigen (Burmeister 2000).

1.1.2.2 Biologische Diversität von Insektenseide

Bisher wurden 23 „Abstammungslinien“ von Insektenseide postuliert, Seidensysteme sind demnach im Laufe der Evolution mehrfach unabhängig voneinander entstanden (Sutherland, Young *et al.* 2010).

Insektenseide erfüllt in höchst unterschiedlichen Kontexten ihre biologische Funktion, allein im Kontext der Fortpflanzung wurden unterschiedliche Verwendungen beobachtet: Männliche Papierfischchen (*Ctenolepisma longicaudata*) produzieren Seidenfasern als taktile Stimuli während der Paarung (Walker, Church *et al.* 2013), zudem dient bei vielen Insektenarten Seide als schützende Struktur bei der Eiablage, wie etwa bei einigen parasitische Wespen (*Signiphora coquiletti*) oder bei Staubläusen der Ordnung Psocoptera (Richards und Davies 1977; Woolley und Vet 1980). Diese schützende Struktur kann auch in Form eines Komposits verarbeitet werden, indem wie bei Honigbienen (*Apis mellifera*) Seide in das Wachs der Waben eingearbeitet wird (Hepburn und Kurstjens 1988; Sutherland, Weisman *et al.* 2012).

Seide kommt auch zum Schutz von höheren Entwicklungsstadien zum Einsatz, beispielsweise dient sie den Adultformen einiger Grillenarten (*Hyalogryllacris spec.*) zum Nestbau (Church, Woodhead *et al.* 2013). Des Weiteren konstruieren die aquatisch lebenden Larven der Köcherfliegen (Ordnung: Trichoptera) mit Hilfe von Seide eine mit Steinen verstärkte Schutzhülle (Stewart und Wang 2010). Andere Larven dieser Ordnung sind in der Lage, aus ihrem Seidenmaterial Fangnetze zum Zweck der Nahrungsbeschaffung in Fließgewässern zu bauen (Ashton, Taggart *et al.* 2012). Die Larven der Langhornmücke (*Arachnocampa luminosa*) hingegen spinnen freihängende, klebrige Fangfäden von Höhlendecken herab, in denen sich Beute verfängt, die durch die Biolumineszenz der Larven angelockt werden (Walker, Weisman *et al.* 2015).

Kokons dienen entweder zum Schutz von Eiern oder zum Erhalt der Puppenruhe. Kokons können prinzipiell jede der fünf bekannten geordneten Proteinstrukturen enthalten: Allein in der Ordnung der Hautflügler (Hymenoptera) wurde entweder beta-sheet, Polyglycin II oder *coiled coil* als jeweils vorherrschende Proteinstruktur in Kokons nachgewiesen (Sehnal und Sutherland 2008). Es wird angenommen, dass in der Evolutionsgeschichte der Hymenoptera zunächst beta-Faltblatt-bildende Strukturproteine für Kokons genutzt wurden (Sutherland, Weisman *et al.* 2012). Erst relativ spät entwickelten sich innerhalb dieser Ordnung weitere Seidensysteme, die für die Herstellung von Kokons zum Einsatz kamen (Sutherland, Weisman *et al.* 2012). Es erscheint unwahrscheinlich, dass sich hierbei beispielsweise ein *coiled-coil*-basiertes Seidensystem aus einem bestehenden beta-Faltblatt-basiertem System entwickelt hat, da die für ein Seidensystem charakteristischen repetitiven Motive wohl nicht zu repetitiven Motiven eines anderen Systems evolutionär transformieren können, ohne Zwischenstufen mit mangelhaften mechanischen Eigenschaften hervorzubringen (Sehnal und Sutherland 2008).

Prinzipiell kann ein Kokon mittels weiterer Strukturproteine an ein Substrat befestigt werden, wie dies bei einigen Larven der Taufliege (*Drosophila spec.*) beobachtet wurde (Lanio, Swida *et al.* 1994; Roth, Wattler *et al.* 1999). Dieses Material wurde jedoch als ein reiner Klebstoff identifiziert.

1.1.2.3 Florfliegenseide

Florfliegen (Chrysopidae), auch Goldaugen genannt, stellen eine Familie in der Ordnung der Netzflügler (Neuroptera) dar. Ihre durchscheinenden und feinstrukturierten Flügel zeichnen sie als namensgebendes Merkmal aus (Abbildung 2). Die Gemeine Florfliege (*Chrysoperla carnea*) ist die am weitesten verbreitete Art in Mitteleuropa und ist zudem in Nordafrika, Nordamerika und Asien, jedoch nicht in Australien und Neuseeland verbreitet; dort existiert unter anderem die

endemische Art *Mallada signata* (New 2002). Die Gemeine Florfliege weist eine grüne Färbung auf, die während der Überwinterung in eine braune Färbung übergeht. Die Imagines ernähren sich von Pollen, Nektar und Honigtau, im Gegensatz dazu leben die Larven der Florfliegen räuberisch. Dieser Umstand wird in der Landwirtschaft ausgenutzt, indem die Larven zur Bekämpfung von Läusen als Nützlinge ausgesetzt werden. Bei Nahrungsmangel weisen die Larven jedoch kannibalisches Verhalten auf, was ihre Aufzucht erschwert.

Die Larven durchlaufen drei Häutungen, bevor sie sich verpuppen (Wyniger 1974). Zu diesem Zweck produzieren sie einen Kokon, dessen Proteinkomponente hauptsächlich aus einem 49 kDa großen Seidenprotein besteht (Weisman, Trueman *et al.* 2008).



Abbildung 2: Weibliche Florfliege (*Chrysoperla carnea*) (links) und ein Eierstiel, bestehend aus einem Seidenfilament und einem daran angehängten Ei (rechts). Durch diese Form der Eiablage ist das Ei vor Fressfeinden geschützt. Darstellung des Eierstiels modifiziert nach (Neuenfeldt und Scheibel 2017).

1.1.2.3.1 Die Seide des Eierstiels

Alle Weibchen der Familie Chrysopidae produzieren Seidenfasern zum Zweck der Eiablage (Weisman, Okada *et al.* 2009). Hierfür sezernieren sie eine Seidenproteinlösung am distalen Ende ihres Abdomens auf einen Untergrund (häufig auf einer Blattunterseite), aus dem sie durch Anheben ihres Hinterleibes einen Faden ziehen. Erst jetzt wird am Ende dieses Fadens ein Ei angehängt und das Weibchen harrt in dieser Körperposition aus, bis der Faden ausgehärtet ist (Abbildung 3). Die resultierende Faser, auch Eierstiel genannt, schützt das vom Untergrund erhöhte Ei vor Fressfeinden (Duelli 1986). Bemerkenswerterweise ist für diesen Spinnprozess kein Spinnapparat notwendig; Sekretion der Seidenlösung und Faserproduktion fallen zeitlich nicht exakt zusammen, zudem erfolgt die eigentliche Faserproduktion komplett außerhalb des Insektenkörpers.

Florfliegen sind somit die einzigen Insekten, welche zwei Sorten von Seide produzieren können: Neben der Seide des Eierstiels auch eine Seide für die Herstellung von Kokons (Sutherland, Young *et al.* 2010). Interessanterweise kann in der verwandten Familie Hemerobiidae ebenfalls eine Eiablage beobachtet werden, bei der die Eier vom Untergrund erhöht abgelegt werden: Jedoch erfolgt hier die Eiablage an bereits bestehenden Strukturen des Habitats, wie etwa an Blattspitzen von Nadelbäumen oder an Haarstrukturen von Maisblättern (Duelli 1986).

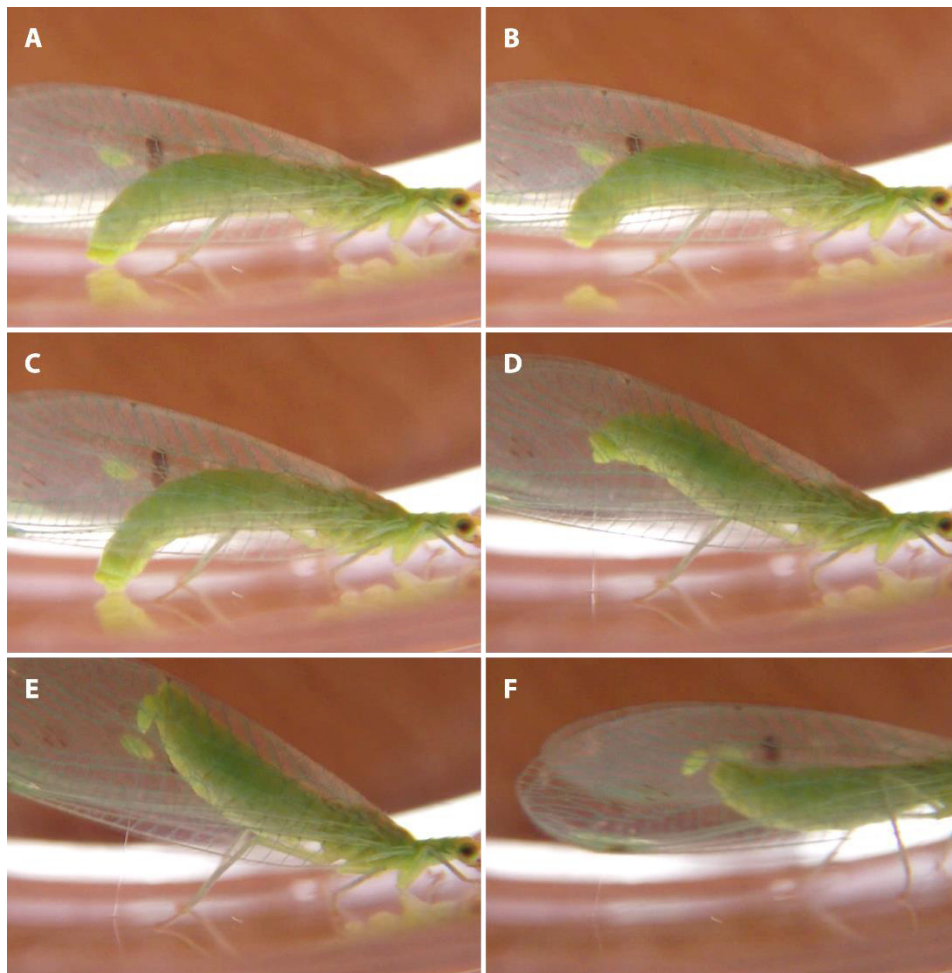


Abbildung 3: Detaillierter Ablauf der Eiablage bei *C. carnea*. Der Prozess beginnt mit dem mehrfachen Berühren eines Untergrunds mit dem distalen Ende des Abdomens, jedoch ohne sichtbare Freisetzung einer Spinnlösung (A und B). Nach der letzten Berührung erfolgt die Freisetzung eines Tropfens der Spinnlösung, in diesem Stadium scheint der Austritt in Form einer Extrusion zu erfolgen (C). Mithilfe ihres Abdomens zieht das Weibchen einen Seidenfaden (D), an dessen Ende es erst jetzt ein Ei anhängt (E). Das Weibchen verharrt nun für einige Sekunden in dieser Position bis die Seidenfaser genügend ausgehärtet ist und gibt erst dann das Ei endgültig frei (F). Bilder entnommen mit freundlicher Genehmigung aus nicht veröffentlichtem Videomaterial von Felix Bauer.

Die 15-20 μm dicken und ca. 1 cm langen Eierstiele weisen einen hohen Anteil an beta-Faltblättern auf, bei denen die beta-Stränge senkrecht zur Faserachse ausgerichtet sind (*cross-beta* Struktur) (Parker und Rudall 1957). Die resultierende strukturelle Anisotropie der Seidenfaser ist durch ihre Fähigkeit zur Doppelbrechung nachweisbar (Bauer und Scheibel 2012). Röntgenstrukturanalysen offenbarten zudem, dass durch die Dehnung der Seidenfaser eine konformationelle Reorganisation zugunsten paralleler beta-Faltblätter erfolgt (Parker und Rudall 1957). Das Ausmaß dieser Reorganisation ist stark von der relativen Luftfeuchtigkeit abhängig, was mit einer erhöhten Dynamik der Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Systems erklärt werden kann (Bauer, Bertinetti *et al.* 2012). Die Dehnung der Eierstiele ist irreversibel.

Im Sockel des Eierstiels, der streng genommen als Film aufgefasst werden kann, kann ebenfalls Anisotropie nachgewiesen werden, da hier die Polypeptidketten senkrecht zur Filmebene ausgerichtet sind (Parker und Rudall 1957). Dieser Sachverhalt führte zu Spekulationen, inwieweit die Materialeigenschaften des Untergrunds die Organisation der Seidenproteine im Eierstiel beeinflussen können.

Mittels Röntgenstrukturanalyse konnte auch ein Modell für die räumliche Verteilung der Proteinmoleküle im Eierstiel abgeleitet werden (Geddes, Parker *et al.* 1968). Demnach enthält der Eierstiel bandartige, 25 Å breite Mizellen, die bezüglich ihrer Länge parallel zur Faser ausgerichtet sind (Abbildung 1). Der durchschnittliche Abstand zweier parallel ausgerichteter Mizellen beträgt 15 ± 4 Å. Die beta-Faltblätter eines einzelnen Seidenproteins liegen in *cross-beta* Konformation vor, innerhalb einer Mizelle sind mehrere dieser Strukturen entlang der dritten räumlichen Achse übereinandergestapelt (Abbildung 4). Entlang dieser Achse sind die beta-Faltblätter benachbarter Proteinmoleküle mit einem Abstand von 5,42 Å antiparallel ausgerichtet (Weisman, Okada *et al.* 2009).

Aufeinanderfolgende beta-Stränge sind durch *beta-turns* miteinander verbunden, beide Strukturelemente werden jeweils durch vier Aminosäurereste repräsentiert. Der Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden beta-Strängen beträgt 4,69 Å (Weisman, Okada *et al.* 2009).

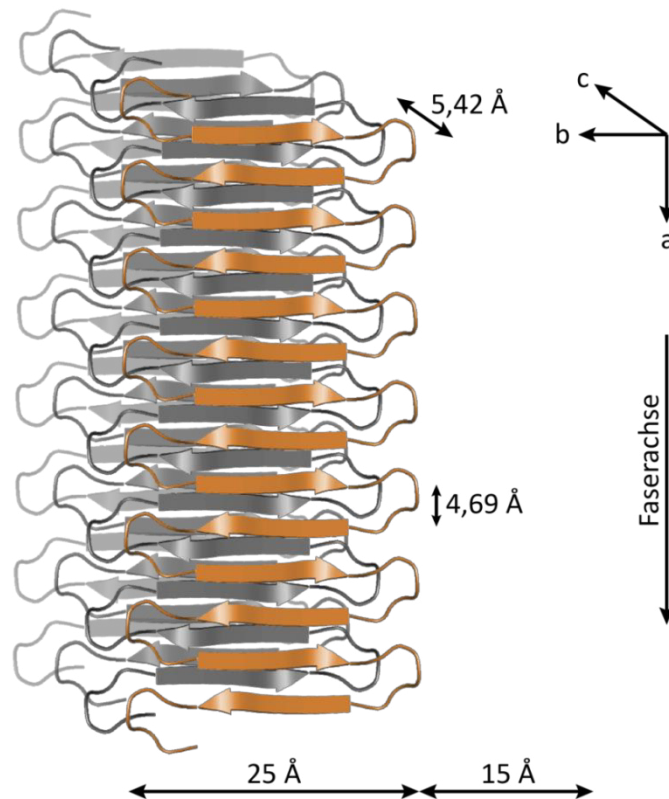


Abbildung 4: Schematisches Modell der Proteinstrukturen innerhalb des Eierstiels von Florfliegen. Entlang der Faserachse (a-Achse) ergeben beta-Stränge und beta-turns in alternierender Folge eine *cross-beta* Konformation. Entlang der c-Achse sind mehrere dieser Strukturen übereinandergestapelt, hierbei sind die intermolekularen beta-Faltblätter antiparallel ausgerichtet. Die Angaben der räumlichen Abmessungen sind entnommen aus (Weisman, Okada *et al.* 2009). Möglicherweise besteht innerhalb dieser Seidenfaser ein zusätzliches Netzwerk aus Disulfidbrücken, jedoch sind intramolekulare Disulfidbrücken zwischen einzelnen beta-Strängen ausgeschlossen, da die beta-Strangbildenden Sequenzbereiche über keine hierfür notwendigen Cysteinreste verfügen.

Die Proteine des Eierstiels enthalten über 80 Molprozent die Aminosäurenreste Serin (41%), Glycin (24%) und Alanin (20%) (Lucas, Shaw *et al.* 1957). Basierend auf Analysen von cDNA-Bibliotheken für die australische Spezies *Mallada signata* gelang im Jahr 2009 erstmals die Sequenzierung von zwei Genen, welche für Eierstielpoteine kodieren (Weisman, Okada *et al.* 2009). Die entsprechenden Proteine, genannt MalXB1 (86 kDa) und MalXB2 (55 kDa), weisen beide repetitive Kerndomänen mit einer Periodizität von stets 16 Aminosäureresten auf, welche entweder eine positive oder negative Nettoladung aufweisen (vergleiche auch Abbildung 11 in der Synopsis). MalXB2 besitzt nur eine repetitive Kerndomäne, MalXB1 hingegen zwei Kerndomänen mit gegensätzlicher Nettoladung, welche durch eine kurze, nichtrepetitive Domäne miteinander verbunden sind. MalXB1 kann somit auch als Diblockcopolymer aufgefasst werden (siehe auch Kapitel 1.3.1.3).

1.2 Rekombinante Herstellung von Seidenproteinen

Seit dem Altertum sind Menschen fasziniert von Seide; zunächst war das ästhetische Erscheinungsbild von Seidentextilien ein wesentlicher Grund für die Motivation, Seide zu erforschen und sich nutzbar zu machen. Des Weiteren wurden bereits früh die Einsatzmöglichkeiten von Spinnenseide für Wundbehandlungen diskutiert (Bon 1710). Zusätzlich zu den außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften vieler Seidensysteme existiert ein verstärktes Interesse an seidenbasierten Materialien auch aufgrund ihrer Biokompatibilität und Umweltverträglichkeit (Gosline, Guerette *et al.* 1999; Lintz und Scheibel 2013).

Voraussetzung für die Erforschung und Etablierung von Seidenprodukten für technische oder medizinische Anwendungen ist ihre großtechnische Produktion, welche eine konstante Produktqualität gewährleistet (Heidebrecht und Scheibel 2013). Die Seide der Seidenspinnerraupe (*B. mori*) ist die bisher einzige Seide unmittelbar natürlichen Ursprungs, welche im großtechnischen Maßstab produziert werden kann; die weltweite Jahresproduktion dieser Seide lag 2014 bei 178 000 Tonnen (Scheibel, Zahn *et al.* 2016). Für viele andere Seidensysteme ergeben sich jedoch Komplikationen, welche eine Zucht der entsprechenden seidenproduzierenden Spezies nicht ökonomisch sinnvoll erscheinen lassen: Kannibalisches Verhalten der Spezies während der Aufzucht, Abhängigkeit der Seidenqualität von Umweltfaktoren oder zu geringe absolute Mengen an Seidenmaterial pro Tier sind gewichtige Faktoren, welche einer Seidenproduktion direkt aus dem natürlichen System heraus entgegenstehen können (Spiess, Lammel *et al.* 2010; Heidebrecht und Scheibel 2013).

Mit biotechnologischen Strategien können diese Produktionshindernisse komplett umgangen werden, indem die Seidenproteine mithilfe von gentechnisch veränderten Organismen rekombinant hergestellt werden (Spiess, Lammel *et al.* 2010). Eine Voraussetzung hierfür ist eine Codon-Anpassung von Seidenprotein-kodierenden Gensequenzen an einen Produktionsorganismus der Wahl. Mit entsprechend angepassten Gensequenzen, welche aus einer wiederholten Aneinanderreihung seidenproteinkodierender DNA-Fragmente hervorgegangen sind, konnten erste vielversprechende Ergebnisse bei der Produktion von Seidenproteinen erzielt werden (Prince, McGrath *et al.* 1995).

Sind die repetitiven Proteinsequenzbereiche bekannt, welche für die charakteristischen strukturellen Eigenschaften eines Seidenproteins verantwortlich sind, kann basierend auf diesen repetitiven Bereichen jeweils ein Konsensmotiv definiert werden (Abbildung 5). Entsprechende synthetische Gene können nach ausreichender Multimerisierung für künstliche Seidenproteine kodieren, welche die wesentlichen biochemischen Eigenschaften nativer Seidenproteine besitzen (Vendrely und Scheibel 2007). Mittels eines biomimetischen Ansatzes können zudem die

modulartig zusammengesetzten repetitiven Genelemente mit Genabschnitten flankiert werden, welche für native terminale Domänen von Seidenproteinen kodieren, wodurch die resultierenden Seidenproteine ihren natürlichen Vorbildern bezüglich ihres Faserassemblierungsverhaltens ähneln (Scheibel 2004). Mit dieser Strategie lassen sich auch aus mehreren tausend Aminosäuren bestehende Seidenproteine nachempfinden, die aufgrund ihrer Größe einer rekombinanten Produktion in Bakterien nicht zugänglich sind.

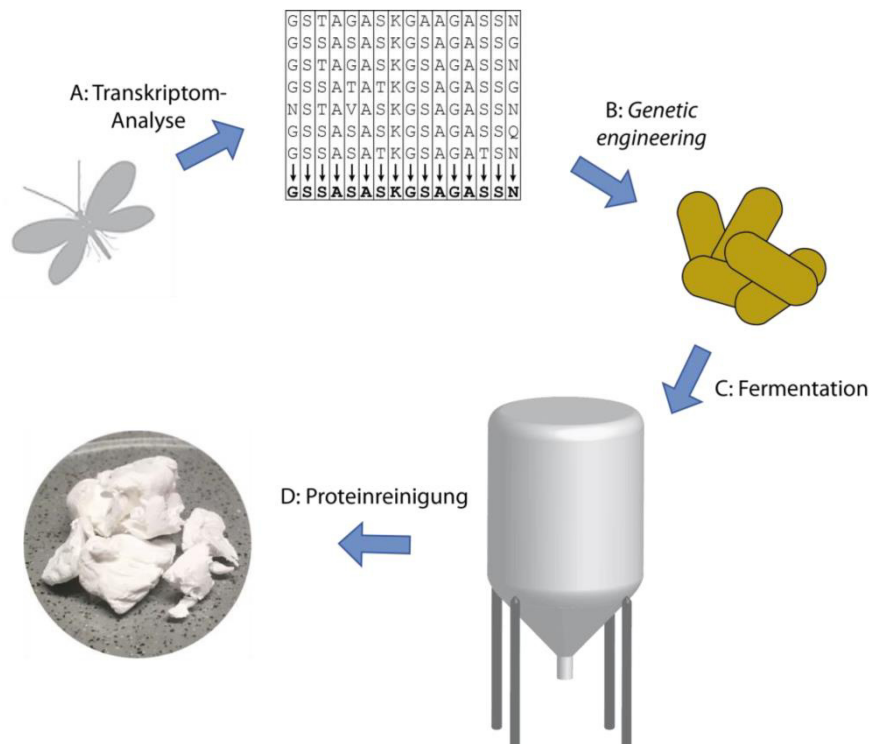


Abbildung 5: Strategie der biotechnologischen Produktion von Seidenproteinen. Die Transkriptom-Analyse (A) einer seidenproduzierenden Spezies resultiert in repetitiven Sequenzbereiche von Seidenproteinen, auf deren Basis Konsenssequenzen definiert werden können (fett markierter Ein-Buchstabencode). Hierfür kodierende synthetische Gene werden an den Codon-Gebrauch des Wirtsorganismus angepasst und diesem mit gentechnischen Methoden zugeführt (B). Während der Fermentation (C) erfolgt die Expression der Seidenproteine innerhalb eines Bioreaktors. Aus der resultierenden Zellmasse werden die Seidenproteine mittels unterschiedlicher Reinigungsverfahren in Reinform isoliert (D).

Die biotechnologische Produktion von künstlichen Seidenproteinen erfolgt üblicherweise in *Escherichia coli* als Wirtsorganismus, jedoch können Seidenproteine auch in Hefe- oder Insektenzellen rekombinant hergestellt werden (Fahnestock und Bedzyk 1997; Vendrely und Scheibel 2007). Für den letzteren Fall ist eine Codon-Anpassung der Seidenprotein-kodierenden Gene praktisch obsolet, da die Proteinbiosynthese innerhalb des Stamms der Arthropoden nur unwesentlich variiert (Vendrely und Scheibel 2007).

Außerdem wurde bereits die rekombinante Seidenproduktion in transgenen Organismen wie *B. mori*, Mäusen, Ziegen oder Tabakpflanzen getestet (Mori und Tsukada 2000; Menassa, Hong *et al.* 2004; Heidebrecht und Scheibel 2013). Grundsätzlich erweisen sich diese Produktionsstrategien jedoch als schwierig, da sich die genetische Manipulation dieser Zielorganismen als sehr komplex und zeitaufwendig herausgestellt hat (Heidebrecht und Scheibel 2013). Selbst für den Fall eines spinnfähigen Wirtsorganismus wie *B. mori* sind wirtsfremde Seidenproteine normalerweise inkompatibel zum Spinnprozess des Wirtes.

Da Seidenproteine meist einen hohen Anteil an Glycin-, Alanin- und Serinresten aufweisen, kann das entsprechende tRNA-Reservoir des Wirtsorganismus eine Limitierung für die Herstellung besonders großer Seidenproteinkonstrukte darstellen. Für rekombinant hergestellte Proteinkonstrukte mit mehr als ca. 1200 Aminosäureresten kann daher eine Manipulation des Wirtsmetabolismus sinnvoll sein, wodurch dem Wirtsorganismus die für die Translation besonders häufig verwendeten tRNA-Moleküle im erhöhten Maße zur Verfügung gestellt werden (Römer und Scheibel 2007; Xia, Qian *et al.* 2010).

Eine rekombinante Proteinproduktion weist den grundsätzlichen Vorteil auf, dass mithilfe molekularbiologischer Methoden sehr einfach weitere Peptid- oder Proteineinheiten in Seidenproteine eingeführt werden können, wodurch beispielsweise die Biokompatibilität des finalen Seidenmaterials verbessert werden kann (Wohlrab, Muller *et al.* 2012). Die Modifikation von Seidenproteinen kann jedoch auch posttranslational erfolgen, auf diese Weise können auch nicht-proteinbasierte Moleküle mittels Click-Chemie an Seidenproteine konjugiert werden (Humenik und Scheibel 2014).

Bislang konnten vor allem verschiedene Spinnenseidenproteine sowie Seidenproteine der Honigbiene rekombinant hergestellt werden (Weisman, Haritos *et al.* 2010; Kaplan und Scheibel 2017). Basierend auf einem Seidenprotein der australischen Florfliege *Mallada signata* konnte außerdem bereits ein künstliches Seidenprotein, genannt N[AS]₈C, in *E. coli* produziert werden (Bauer und Scheibel 2012). Das achtfach multimerisierte AS-Modul repräsentiert eine Konsensussequenz, welche aus der repetitiven Kerndomäne des Eierstielproteins MalXB2 abgeleitet wurde (Weisman, Okada *et al.* 2009). Die N- und C-terminalen Domänen von N[AS]₈C repräsentieren die entsprechenden terminalen Domänen von MalXB2.

Grundsätzlich hat sich für rekombinant hergestellte Seidenproteine herausgestellt, dass sie häufig mittels einer sequentiellen selektiven Fällungsstrategie aus dem Wirtsorganismus isoliert werden können (Xia, Qian *et al.* 2010; Bauer und Scheibel 2012). Dieser Sachverhalt kann die Wirtschaftlichkeit des entsprechenden industriellen Herstellungsprozesses verbessern, da hier-

durch eine materialintensive Reinigungsstrategie per Säulenchromatographie vermieden werden kann. Außerdem lässt sich der Maßstab einer Proteinreinigung, welche ohne säulenchromatographische Reinigungsschritte durchgeführt wird, leichter skalieren (Heim, Römer *et al.* 2010).

1.3 Assemblierung von Seidenproteinen zu Fasern

1.3.1 Thermodynamische Grundlagen der Selbstassemblierung von Makromolekülen

Je umfangreicher die naturwissenschaftliche Forschung Einblicke in geordnete biologische Strukturen auf mikroskopischer Ebene erlaubte, desto stärker drängte sich die Frage nach der Triebkraft auf, welche diesen Ordnungsgrad ermöglicht. Phänomene wie die komplexen Membranstrukturen von Zellen schienen zunächst der Erkenntnis aus der Thermodynamik zu widersprechen, nach der jedes System den Grad höchstmöglicher Unordnung anstrebt. Auch bezogen auf Seidensysteme gilt es zu erklären, wie ein komplexes Proteingemisch im Zuge des natürlichen Spinnprozesses einen hochgeordneten flüssigkristallinen Zustand durchlaufen kann (Kerkam, Viney *et al.* 1991; Vollrath und Knight 2001). Interessanterweise haben weiterführende Überlegungen auf dem Fachgebiet der Thermodynamik diesen scheinbaren Widerspruch aufzulösen vermocht, wodurch Selbstassemblierungsprozesse von Makromolekülen verständlich wurden. Im Folgenden sollen die Grundzüge dieser Erkenntnisse im Hinblick auf ihre Relevanz für biologische Makromoleküle wie Seidenproteine zusammengefasst werden.

Lyotrope Flüssigkristalle werden von gelösten Makromolekülen gebildet (griechisch: *lyein* – lösen, *trepein* – richten/wenden). Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein genügend starrer anisotroper Segmente, sogenannter Mesogene, innerhalb der Makromoleküle (Elias 2009a). Außerdem erfolgt die Bildung dieser Flüssigkristalle nur oberhalb einer kritischen Konzentration, bzw. eines kritischen Volumenbruchs. Aufgrund entropischer Effekte wird ab diesem kritischen Volumenbruch eine anisotrope Orientierung der gelösten Makromoleküle begünstigt, diese Größe ist in guter Näherung von der geometrischen Beschaffenheit des jeweiligen Makromoleküls abhängig (Flory 1956):

$$(1) \quad \phi_{\text{krit}} = \frac{8(1-\frac{2}{\Lambda})}{\Lambda}$$

mit $\Lambda = L/d$ als das Achsenverhältnis des Makromoleküls mit der Länge L und dem Durchmesser d .

Dieser Zusammenhang ist jedoch nur für Makromoleküle gültig, die als steife Stäbchen interpretiert werden können. Für ein Achsenverhältnis von $\Lambda = 40$ wird beispielsweise ein Wert von $\varphi_{\text{krit}} = 0,19$ von der Näherungsgleichung vorausgesagt, oberhalb dessen die einfache geometrische Beschaffenheit des Makromoleküls für die Bildung von Flüssigkristallen eine ausreichende Bedingung darstellt. Zwar verliert das Gesamtsystem durch die Ordnung der Makromoleküle an Rotationsentropie, jedoch wird dies durch die Zunahme an Translationsentropie überkompensiert.

1.3.1.1 Die Flory-Huggins-Theorie

Mithilfe der Flory-Huggins-Theorie kann das Verhalten von gelösten, flexiblen Polymeren erklärt werden. Im gewissen Maße trägt sie somit auch zum Verständnis von Selbstassemblierungseigenschaften von Proteinen bei, jedoch muss die Theorie hierfür umfangreich erweitert werden, um der Komplexität von Proteinstrukturen gerecht zu werden (Fried 2003). Mit der folgenden Herleitung soll jedoch gezeigt werden, dass bereits mit vergleichsweise einfachen Überlegungen Eigenschaften von Makromolekülen wie die Phasentrennung verständlich werden. Im Zuge dessen wird auch auf die Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse auf Proteine eingegangen.

Zunächst soll ein einfaches Gittermodell herangezogen werden, bei dem jeder Gitterplatz entweder von einem Lösungsmittelmolekül oder von einer Monomereinheit eines gelösten Moleküls besetzt wird. Abbildung 6 gibt die zufällige Verteilung eines gelösten, niedermolekularen Monomers (Index 2) in einem Lösungsmittel (Index 1) wieder:

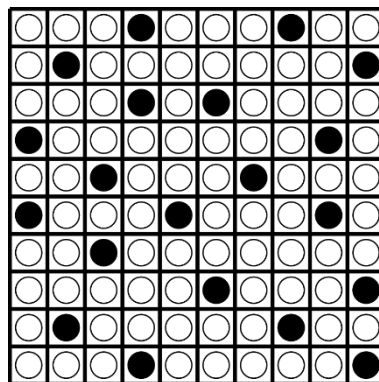


Abbildung 6: Veranschaulichung des Gittermodells für ein gelöstes Monomer. Jeder Gitterplatz ist entweder von einem Lösungsmittelmolekül (weiße Kreise) oder von einem Molekül eines gelösten Stoffs (schwarze Kreise) besetzt. Die Entropie dieses Systems lässt sich mittels statistischer Thermodynamik beschreiben. Abbildung stark modifiziert nach (Fried 2003).

Mithilfe der statistischen Thermodynamik lässt sich die Erhöhung der Entropie, ΔS_{mix} , durch die Vermischung folgendermaßen beschreiben:

$$(2) \quad \Delta S_{\text{mix}} = k_B \ln \Omega$$

mit k_B als die Boltzmann Konstante ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) sowie Ω als die Anzahl der Anordnungsmöglichkeiten der Teilchen auf dem Gitter, welche wiederum angegeben werden kann als

$$(3) \quad \Omega = \frac{n!}{n_1 \cdot n_2}$$

mit n als die Gesamtzahl an Gitterplätzen sowie n_1 als die Zahl an vom Lösungsmittel besetzten Plätze und n_2 als die Zahl an vom gelösten Stoff besetzten Plätze. Mithilfe der Stirlingformel

$$(4) \quad \ln n! \approx n \ln(n) - n$$

sowie der Verwendung der Volumenbrüche ϕ

$$(5) \quad \phi_1 = \frac{n_1}{n} ; \phi_2 = \frac{n_2}{n}$$

ergibt sich für die Mischungsentropie pro Mol Gitterplatz (Elias 2009b):

$$(6) \quad \Delta S_{\text{mix,m}} = -R(\phi_1 \ln \phi_1 + \phi_2 \ln \phi_2)$$

mit R als die Gaskonstante.

Für gelöste Polymere, bei denen jede Monomereinheit einen Gitterplatz besetzt, ergibt sich hingegen folgendes Bild:

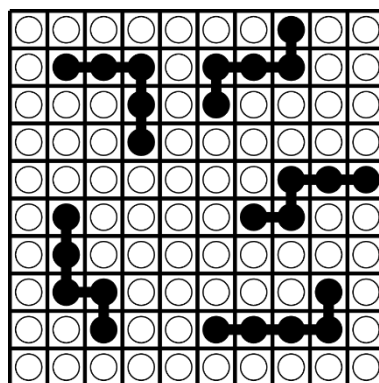


Abbildung 7: Veranschaulichung des Gittermodells für ein gelöstes Polymer. Aufgrund der Verknüpfung der Monomersegmente (schwarze Kreise) reduziert sich im Vergleich zu gelösten, unverknüpften Monomeren die Entropie des Systems. Abbildung stark modifiziert nach (Fried 2003).

Der Polymerisationsgrad N_2 , also die Anzahl an Monomeren pro Kette, fließt folgendermaßen in die Berechnung der Mischungsentropie pro Mol Gitterplatz ein (Elias 2009b):

$$(7) \quad \Delta S_{\text{mix,m}} = -R(\phi_1 \ln \phi_1 + \frac{\phi_2}{N_2} \ln \phi_2)$$

Es wird ersichtlich, dass sich aufgrund der Verknüpfung der Monomersegmente die Freiheitsgrade der einzelnen Monomersegmente reduzieren, wodurch der Beitrag des Polymers zur Entropie geringer ausfällt als im Vergleich zu gelösten Monomeren. Diese rein statistische Erkenntnis berücksichtigt noch nicht die physikochemischen Eigenschaften der Monomere und ist somit auch gültig für Polymere, welche aus unterschiedlichen Monomeren bestehen, wie beispielsweise Proteine bestehend aus bis zu 20 unterschiedlichen Aminosäuren. Die Bedeutung möglicher Interaktionen zwischen diesen Aminosäureresten wird im weiteren Verlauf dieses Kapitels diskutiert.

Für die Betrachtung der Mischungsentropie wurde angenommen, dass es sich stets um ideale Lösungen handelt (Mischungsenthalpie $\Delta H_{\text{mix}} = 0$). Für reale Lösungen lassen sich jedoch Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und gelöstem Polymer feststellen, weshalb von Flory und Huggins ein dimensionsloser Wechselwirkungsparameter χ definiert wurde (Elias 2009b):

$$(8) \quad \chi = \frac{z\Delta\varepsilon}{k_B T}$$

mit $\Delta\varepsilon$ als die Austauschenergie zwischen einem Lösungsmittelmolekül und einer Monomereinheit des Polymers, sowie mit z als die Zahl der benachbarten Gitterplätze eines solchen Paares. An dieser Stelle wird offensichtlich, dass diese Definition keine Gültigkeit für Proteine besitzt, da Proteine stets heterogene Polymere darstellen. Es ist jedoch möglich, χ für Protein-Lösungsmittel-Systeme experimentell zu ermitteln (Freddi, Pessina *et al.* 1999).

Bezogen auf homogene Polymere fließt der Flory-Huggins-Wechselwirkungsparameter folgendermaßen in die Berechnung der Änderung der molaren Mischungsenthalpie $\Delta H_{\text{mix,m}}$ ein (Elias 2009b):

$$(9) \quad \Delta H_{\text{mix,m}} = \chi RT \phi_1 \phi_2$$

Grundsätzlich beschreibt der Parameter χ die thermodynamische Güte des Lösungsmittels für ein jeweiliges Polymer und ist der einzige materialspezifische Parameter in der Flory-Huggins-Theorie (Elias 2009b). Er besitzt einen empirischen Charakter und kann sowohl negative als auch positive Werte annehmen. Gemäß der theoretischen Herleitung erscheint er als rein enthalpische Größe, experimentell wurde jedoch auch eine entropische Komponente festgestellt (Elias 2009b).

1.3.1.2 Phasentrennung

Ausgehend von der Berechnungsformel für die molare Gibbs-Mischungsenergie $\Delta G_{\text{mix,m}}$

$$(10) \quad \Delta G_{\text{mix,m}} = \Delta H_{\text{mix,m}} - T\Delta S_{\text{mix,m}}$$

lässt sich die molare Gibbs-Mischungsenergie gemäß der Flory-Huggins-Theorie mittels Verwendung der Gleichungen (7) und (9) auch angeben als:

$$(11) \quad \Delta G_{\text{mix,m}} = RT[\chi\phi_1\phi_2 + \phi_1\ln\phi_1 + \frac{\phi_2}{N_2}\ln\phi_2]$$

Die notwendige Voraussetzung für die Mischbarkeit zweier Komponenten ist ein Wert kleiner Null für die Gibbs-Mischungsenergie $\Delta G_{\text{mix,m}}$. Für die völlige Mischbarkeit über den gesamten Zusammensetzungsbereich muss zusätzlich die zweite Ableitung von $\Delta G_{\text{mix,m}}$ nach dem Volumenbruch ϕ stets einen Wert größer Null annehmen (Fried 2003). Zudem besagt das Gibbs'sche Stabilitätskriterium, dass die freie Enthalpie in einem adiabatischen System im Gleichgewicht stets einen minimalen Wert anstrebt. Mittels Berechnung der Gibbs-Mischungsenergie als Funktion des Volumenbruchs kann somit die Stabilität einer Polymerlösung für jeden beliebigen Volumenbruch vorhergesagt werden. Im Bereich eines lokalen Maximums wird ersichtlich, dass das Gesamtsystem einen niedrigeren Wert für $\Delta G_{\text{mix,m}}$ annehmen kann, wenn sich zwei Phasen mit unterschiedlichem Volumenbruch des Polymers ausbilden (Abbildung 8).

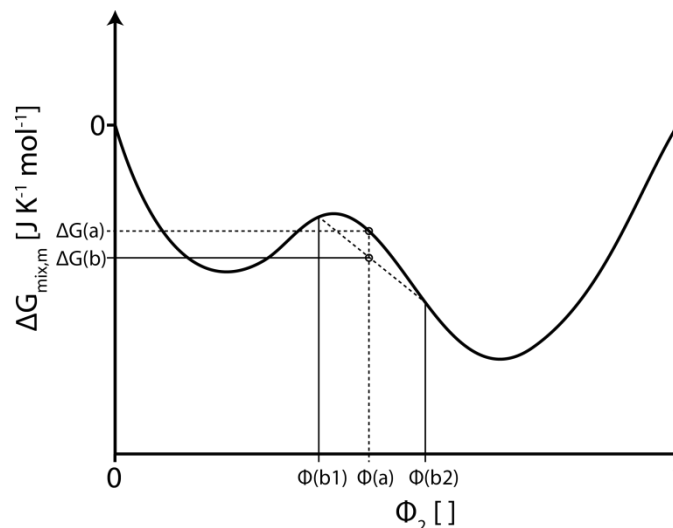


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Einflusses der molaren Gibbs-Mischungsenergie $\Delta G_{\text{mix,m}}$ auf die Phasentrennung einer Mischung mit dem Volumenbruch Φ_2 eines Polymers. Gemäß dem Gibbs'schen Stabilitätskriterium wäre eine gleichmäßige Mischung eines Polymers mit dem Volumenbruch $\Phi(a)$ thermodynamisch instabil, da sich der dazugehörige Wert der molaren Gibbs-Mischungsenergie $\Delta G(a)$ reduzieren ließe auf $\Delta G(b)$: Wenn sich zwei Phasen mit den Volumenbrüchen $\Phi(b1)$ und $\Phi(b2)$ des Polymers ausbildeten, ergäbe der Mittelwert dieser zwei partiellen Mischungsenergien $\Delta G(b)$. Folglich würde ein System unter diesen Voraussetzungen stets eine Entmischung anstreben.

Aus der Definition des Flory-Huggins-Wechselwirkungsparameters wird ersichtlich, dass es sich bei dieser Größe um eine Zustandsfunktion handelt. Der Parameter ist umgekehrt proportional zur Temperatur, was von Bedeutung für die Erklärung der Phasenseparation ist: Da laut der Flory-Huggins-Theorie mit sinkender Temperatur der Wert des Wechselwirkungsparameters zunimmt, was sich gemäß der Formel (11) ungünstig auf die Gibbs-Mischungsenergie auswirkt, kann für Systeme mit stark ausgeprägter Temperaturabhängigkeit von χ eine obere kritische Lösungstemperatur (englisch: *upper critical solution temperatur*, UCST) bestimmt werden, unterhalb derer eine Entmischung erfolgt. Diese Entmischung erfolgt endotherm (Elias 2009b).

Im Gegensatz dazu können jedoch auch Systeme beobachtet werden, die sich bei einer Zunahme der Temperatur entmischen. Die hierfür kritische Temperatur ist die untere kritische Lösungstemperatur (englisch: *lower critical solution temperature*, LCST). Diese Phasentrennung ist entropisch induziert, der Wechselwirkungsparameter eines solchen Systems nimmt mit der Temperatur zu. Dieses Phänomen kann daher nicht mit der ursprünglichen Flory-Huggins-Theorie erklärt werden, welche χ als rein enthalpische Größe auffasst (Fried 2003). Prinzipiell kann χ als Funktion der Temperatur sogar konvexe oder konkave Kurvenverläufe beschreiben, was in Polymerlösungen mit sowohl einer UCST als auch einer LCST resultiert (Elias 2009b).

Abbildung 9 gibt schematisch die Kurvenverläufe der Gibbs-Mischungsenergie einer Polymerlösung für verschiedene Temperaturen wieder. Es wird ersichtlich dass bei der kritischen Temperatur die Abzissenwerte der Minima, Wendepunkte und des Maximums zusammenfallen, jener Abzissenwert gibt den kritischen Volumenbruch $\phi_{2,k}$ wieder.

Zusätzlich gilt für die kritische Temperatur sowohl für die zweite als auch die dritte Ableitung dieser Isotherme (Fried 2003; Elias 2009b):

$$(12) \quad \left(\frac{\partial^2 \Delta G_{\text{mix},m}}{\partial \Phi_2^2} \right)_{T,p} = RT[2\chi\Phi_2 - (1 - \Phi_2)^{-1} + (1 - N_2^{-1})] = 0$$

$$(13) \quad \left(\frac{\partial^3 \Delta G_{\text{mix},m}}{\partial \Phi_2^3} \right)_{T,p} = RT[2\chi - (1 - \Phi_2)^{-2}] = 0$$

Wenn nun die entsprechenden Differentialgleichungen jeweils nach χ aufgelöst und danach gleichgesetzt werden, ergibt sich für den kritischen Volumenbruch $\phi_{2,k}$ die Beziehung

$$(14) \quad \Phi_{2,k} = \frac{1}{1 + \sqrt{N_2}}$$

Hieraus wird ersichtlich, dass mit zunehmendem Polymerisationsgrad N_2 der kritische Volumenbruch immer kleiner wird, ab dem eine Phasenseparation erfolgt (Elias 2009b).

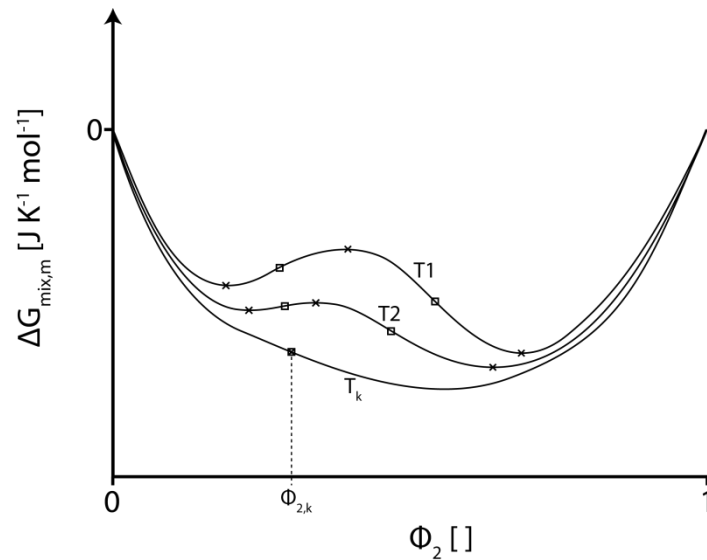


Abbildung 9: Schematische Darstellung von Isothermen der Gibbs-Mischungsenergie $\Delta G_{\text{mix,m}}$ einer Polymerlösung als Funktion des Volumenbruchs Φ_2 eines Polymers. Im Bereich zwischen lokalem Minimum und Wendepunkt einer Isotherme ist eine Lösung metastabil, im Bereich zwischen zwei Wendepunkten ist eine Lösung instabil. Im metastabilen Bereich ist eine Entmischung kinetisch kontrolliert. Je mehr sich die Temperatur der kritischen Temperatur T_k nähert, desto mehr nähern sich die Abzissenwerte der Extrem- und Wendepunkte der dazugehörigen Isotherme einander an, bis sie bei der Isotherme von T_k zusammenfallen. Dieser Abzissenwert stellt den kritischen Volumenbruch $\Phi_{2,k}$ dar. Für UCST gilt $T_k > T_1 > T_2$, für LCST gilt $T_k < T_1 < T_2$. Minima und Maxima sind mit (+) angegeben, Wendepunkte mit (□).

Obwohl die Flory-Huggins-Theorie sehr umfassend die thermodynamischen Zusammenhänge von Polymerlösungen beschreiben kann, bleiben dennoch einige wichtige Faktoren in der Theorie unberücksichtigt: So ist zum einen χ entgegen der ursprünglichen Definition von Flory und Huggins meist nicht unabhängig von ϕ_2 , lediglich in apolaren oder schwach polaren Lösungsmitteln ist eine Unabhängigkeit von ϕ_2 ungefähr gegeben (Elias 2009b). Außerdem vernachlässigt die Theorie Volumenänderungen von Mischungen, obwohl favorisierte Interaktionen zwischen Polymer und Lösungsmittel in eine negative Volumenänderung resultieren sollte (Fried 2003). Zudem ist die Theorie nur anwendbar in ausreichend konzentrierten Lösungen, da nur dann eine gleichmäßige Dichte an Monomersegmenten gegeben ist.

Wie bereits erwähnt kann die Theorie auch kein LCST-Verhalten einer Polymerlösung vorhersagen, da gewisse entropische Effekte vernachlässigt werden. Tragen beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen zur Stabilität einer Polymerlösung bei, entfällt dieser Einfluss bei zunehmender Temperatur aufgrund der thermischen Instabilität jener Interaktion, was eine Entmischung begünstigen kann (Elias 2009b).

Außerdem ist eine proteinbiochemisch relevante Einschränkung der Theorie in der Vernachlässigung von intra- und intermolekularen Wechselwirkungen von Polymeren enthalten. Hierdurch findet das Konformationsverhalten von Proteinen in Lösungen keine Berücksichtigung. Aus den oben genannten Gründen wurde daher im Laufe der Jahre die ursprüngliche Theorie mehrfach modifiziert und überarbeitet (Wolf 1972; Koningsveld, Kleintjens *et al.* 1974; Fried 2003).

1.3.1.3 Blockcopolymere

Copolymere setzen sich aus verschiedenartigen Monomereinheiten zusammen. Bilden die unterschiedlichen Monomereinheiten jeweils Homopolymersegmente innerhalb der linearen Polymerkette, sind die resultierenden Polymermoleküle als Blockcopolymere definiert (Jenkins, Kratochvíl *et al.* 1996).

Erweisen sich diese Blöcke als thermodynamisch nicht miteinander mischbar, strebt dieses System eine Entmischung an. Aufgrund der kovalenten Verknüpfung der Blöcke ist eine komplette Entmischung jedoch nicht möglich, stattdessen lagern sich Blöcke gleicher Art zu lokalen Domänen, genannt Mikrophasen, zusammen (Elias 2009a). Da die unterschiedlichen Mikrophasen sich meist in ihren Brechungsindices unterscheiden, äußert sich die Bildung von Mikrophasen makroskopisch üblicherweise in einer Trübung der Mischung.

Unabhängig von der Unverträglichkeit der Blöcke untereinander kann das eingesetzte Lösungsmittel entweder beide Blöcke gleich gut lösen (indifferente Lösungsmittel) oder ein gutes Lösungsmittel für nur einen Block darstellen (selektives Lösungsmittel) (Elias 2009a). Im letzteren Fall bilden sich micellartige Assoziate, welche entweder sphärische, zylindrische oder lamellare morphologische Grundformen annehmen können. Zylindrische und lamellare Mizellen können zudem bei höheren Polymerkonzentrationen flüssigkristalline Strukturen ausbilden (Elias 2009a).

Für jede Kombination unterschiedlicher Monomereinheiten einer Polymermischung kann jeweils ein Flory-Huggins-Wechselwirkungsparameters bestimmt werden (Ten Brinke, Karasz *et al.* 1983; Bates und Fredrickson 1990). Das Produkt aus Flory-Huggins-Wechselwirkungsparameters χ und dem Polymerisationsgrad N veranschaulicht das Maß der Inkompatibilität zweier unterschiedlicher Homopolymersegmente. Dieses Maß hat einen unmittelbaren Einfluss auf die Morphologie der Mischung: Beispielsweise wurde für Schmelzen eines reinen, symmetrischen Diblockcopolymers ein Wert für $\chi N \approx 10,5$ ermittelt, oberhalb dessen

stets lamellare Strukturen ausgebildet werden (Fredrickson und Bates 1996). Des Weiteren ist im Fall einer Mikrophasenseparation die resultierende Morphologie abhängig vom Volumenverhältnis der Blöcke zueinander (Bates und Fredrickson 1990).

Außerdem wurden bereits morphologische Studien zu Mischungen von einem Blockcopolymer in Homopolymeren durchgeführt: Sind zwei Homopolymere nicht miteinander mischbar, kann ein entsprechendes Diblockcopolymer die Funktion eines Tensids übernehmen (Bates, Maurer *et al.* 1997; Fredrickson und Bates 1997). Die Morphologie dieser Systeme kann unter anderem über die Volumenbrüche der Homopolymere entscheidend kontrolliert werden.

Zusammenfassend war das theoretische Verständnis von Mesophasen eine maßgebliche Voraussetzung für die Entwicklung von Polymeren für industrielle Anwendungen (Jaffe, Chen *et al.* 1994; Mittal 2012). Diese gewonnenen Erkenntnisse sind auch für biologische Hochleistungsfasern wie Seiden äußerst relevant, da die hier zugrundeliegenden Strukturproteine meist nur in entsprechend vorgeordneten Strukturen in hinreichend hoher Konzentration in der Spinndrüse angereichert werden können, ab der das Verspinnen zur Faser erst möglich ist (siehe Kapitel 1.3.2). Zudem können einige Seidenproteine aufgrund ihrer generellen Architektur im gewissen Rahmen als Blockcopolymere interpretiert werden (Exler, Hummerich *et al.* 2007; Weisman, Okada *et al.* 2009).

1.3.2 Natürliche Spinnprozesse von Insektenseide

Als prominentester Vertreter von Insektenseide konnte der Spinnprozess des Seidenspinners (*B. mori*) besonders detailliert analysiert werden (Iizuka 1985; Iizuka 1988; Matsumoto, Kim *et al.* 2007; He, Zhang *et al.* 2012). Makroskopisch betrachtet besteht eine einzelne Faser dieser Seide aus einem Doppelfilament, welches von einer Schicht von Sericinen ummantelt ist (Hardy, Romer *et al.* 2008). Im Doppelfilament ist Fibroin das für die mechanischen Eigenschaften der Faser maßgeblich verantwortliche Protein, welches wiederum aus zwei Polypeptidketten besteht (dem sogenannten *heavy chain fibroin*, ca. 350 kDa, und dem *light chain fibroin*, ca. 25 kDa), die über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden sind (Tanaka, Inoue *et al.* 1999). Über nicht-kovalente hydrophobe Interaktionen ist außerdem ein drittes Protein (P25, ca. 30 kDa) mit Fibroin assoziiert. Es wird angenommen dass jenes Protein zur Intaktheit des Seidensystems während des Spinnprozesses beiträgt (Sehnal und Zurovec 2004). Das molare Verhältnis von *heavy chain fibroin* (H-Fibroin), *light chain fibroin* (L-Fibroin) und P25 beträgt 6:6:1 (Hardy, Romer *et al.* 2008).

Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne des H-Fibroins eine entscheidende Rolle bei der geordneten Assemblierung der Seidenproteine zur finalen Faser einnimmt (He, Zhang *et al.* 2012). Im neutralen pH-Bereich, wie er in der posterioren Region der Spinndrüse vorherrscht, liegt diese Domäne vorwiegend in *random coil* Konformation vor. Zusätzlich sorgen mehrere saure Aminosäurereste innerhalb der Domäne für intermolekulare elektrostatische Abstoßungen. Im anterioren Bereich der Spinndrüse liegt ein lokaler pH-Wert von etwa 4,9 vor, welches die Bildung von beta-Faltblättern als nun vorherrschende Sekundärstruktur in der Domäne begünstigt. Außerdem entfällt in diesem pH-Bereich aufgrund der nun protonierten sauren Aminosäureresten die elektrostatische Abstoßung, wodurch die N-terminalen Domänen Homodimere ausbilden können. Diese Dimerisierung wird zusätzlich durch einen Anstieg der Ionenstärke in diesem Bereich der Drüse stabilisiert. Die nun vorliegende strukturelle Beschaffenheit führt zur Bildung von micellären Strukturen, bei denen die Vielzahl an dimerisierten Domänen wahrscheinlich die Grenzflächen zwischen den Micellen darstellen (He, Zhang *et al.* 2012).

Nur aufgrund dieser vorgeordneten Strukturen können dicht gepackte Micellen entstehen, wodurch Proteinkonzentrationen von bis zu 30 Gewichtsprozent ermöglicht werden, ohne dass dies zu unkontrollierter Proteinaggregation führt (Kerkam, Viney *et al.* 1991; Matsumoto, Kim *et al.* 2007). Kurz vor dem Austritt aus dem Spinnkanal liegen die Seidenproteine schließlich in Form von Flüssigkristallen vor, welche die Grundlage für die Anisotropie des Seidenmaterials darstellt (Kerkam, Viney *et al.* 1991). Durch Einwirken von Scherkräften am distalen Ende des Spinnkanals erfolgt der Phasenübergang zur finalen Seidenfaser, im Zuge dessen die anisotrope molekulare Ausrichtung des Systems sein Maximum erreicht (Jin und Kaplan 2003).

Interessanterweise sind die mechanischen Eigenschaften dieser Seide abhängig von der Spinnengeschwindigkeit (Shao und Vollrath 2002). Niedrige Spinnengeschwindigkeiten ergeben Fasern mit erhöhter Dehnbarkeit, hohe Spinnengeschwindigkeiten ergeben Fasern mit besonders ausgeprägter Festigkeit.

Obwohl für viele weitere Insektenseiden sowohl ihre Proteinsequenzen als auch ihre strukturelle Beschaffenheit in der Seidenfaser bekannt sind, ist ihr jeweiliger Assemblierungsprozess zur Faser meistens noch unbekannt. Lediglich für die Seide der Köcherfliegen (Trichoptera) konnte die Assemblierung auf molekularer Ebene entschlüsselt werden: Köcherfliegen als Nebenordnung der Schmetterlinge (Lepidoptera) produzieren ein Seidenprotein homolog zum H-Fibroin, welches im Zuge der Adaption an den aquatischen Lebensraum posttranslationale Phosphorylierungen aufweist (Stewart und Wang 2010; Ashton, Roe *et al.* 2013). Für die Verar-

beitung zur Seidenfaser wurde eine koazervatgesteuerte Assemblierung postuliert, bei der die entstehende Mesophase einen Komplex aus polyionischem Seidenprotein und Calciumionen darstellt.

1.3.2.1 Der natürliche Spinnprozess der Florfliege

Die entscheidenden Parameter für den Spinnprozess der Eierstielseide von Florfliegen sind bislang völlig unklar. Aufgrund der zeitlichen Trennung von der Sekretion der Seidenlösung und dem Phasenübergang zur Faser stellt sich jedoch die Frage, ob dieser Spinnprozess besonders robust gegenüber Schwankungen physikalischer Prozessparameter ist: Da der Spinnprozess offensichtlich auch eine Extrusion der Seidenlösung beinhaltet, dürfte während dieser Extrusion eine gegebenenfalls bereits vorhandene Anisotropie der Seidenlösung stark beeinträchtigt werden (vergleiche Abbildung 3). Hieraus resultiert die Hypothese, ob die Seidenproteine während des Spinnprozesses der Florfliege die Spinndrüse eher in Form von sphärischen Mizellen verlassen und die Anisotropie der finalen Faser maßgeblich nur während der nachfolgenden Elongation des Seidensekrettropfens induziert wird.

1.3.3 Elektrisches Verspinnen von Seide

1.3.3.1 Grobe Übersicht über mögliche Verarbeitungsprozesse von Seide

Prinzipiell können sowohl rekombinant hergestellte Seidenproteine als auch native Seide zu unterschiedlichen Morphologien verarbeitet werden. Für den letzteren Fall muss zunächst die bestehende Faserstruktur der Seide aufgelöst werden, zu diesem Zweck wird die Seide üblicherweise mithilfe chaotroper Salze in eine Lösung überführt. Dieses Verfahren ist bisher jedoch nur für die Seide der Seidenspinnerraupe praktikabel (Mori und Tsukada 2000). Hierfür werden in einem vorhergehenden Schritt zunächst die Sericin-Klebepeptide mittels Aufkochen entfernt. Nach dem Auflösen des Fibroins und Entfernen der chaotropen Salze mittels Dialyse kann die nun regenerierte Fibroinlösung weiterverarbeitet werden.

Native oder rekombinant hergestellte Seidenproteine können zu Filmen, Hydrogelen, Schäumen oder Fasern (inklusive Vliesstoffe) verarbeitet werden (Spiess, Lammel *et al.* 2010; Hofer, Winter *et al.* 2012; Schacht und Scheibel 2014; Lang, Herold *et al.* 2017). Durch Aussalzen können Seidenproteinlösungen zu sphärischen Partikeln verarbeitet werden, deren Durchmes-

ser sehr gut über die Prozessparameter kontrolliert werden kann (Lammel, Schwab *et al.* 2008). Feste Morphologien wie Fasern oder Filme müssen häufig nach der formgebenden Fabrikation nachbehandelt werden, um eine wasserunlösliche Form anzunehmen. Diese Nachbehandlung kann eine Hitzeeinwirkung, eine mechanische Belastung durch Streckung oder auch eine Einwirkung von Lösungsmitteln darstellen (Heidebrecht, Eisoldt *et al.* 2015; Lang, Herold *et al.* 2017). Allen Nachbehandlungen ist gemein, dass sie den kristallinen Anteil innerhalb der Morphologie erhöhen. Wasser kann in diesem Prozess die Funktion eines Weichmachers übernehmen (Seidel, Liivak *et al.* 2000).

1.3.3.2 Herstellung von Vliesstoffen mittels Elektrospinnverfahren

Per Elektrospinnen können Vliesstoffe produziert werden, deren Einzelfasern einen nanoskaligen Durchmesser besitzen, wodurch sich eine große innere Oberfläche ergibt (Jin, Fridrikh *et al.* 2002).

Grundsätzlich wird für dieses Verfahren ein Polymer entweder in Form einer Schmelze oder im gelösten Zustand verarbeitet. Hierfür wird eine mit Polymer befüllte Spritze einem elektrischen Feld ausgesetzt: Eine Spritzenkanüle fungiert als Elektrode, eine Kollektorplatte ist entgegengesetzt geladen oder wird geerdet (Hohman, Shin *et al.* 2001). Das elektrische Feld induziert eine elektrostatische Ladung an der Phasengrenze zwischen der Polymerlösung bzw. der Polymerschmelze an der Kanülenspitze und der Luft, was zu Ladungsabstoßungen innerhalb dieser Phasengrenze führt, welche wiederum der Oberflächenspannung entgegenwirken. Ist die Ladung stärker als die Oberflächenspannung, verformt sich der Polymertropfen an der Kanülenspitze zum sogenannten Taylor-Konus (Doshi und Reneker 1995). Der gebogene Polymerstrahl wird durch das elektrische Feld beschleunigt und gestreckt, aufgrund der gleichzeitigen Verdunstung des Lösungsmittels (bzw. Abkühlung der Polymerschmelze) trifft das Polymer in Form einer ungeordneten Fasermatte auf die Kollektorplatte auf (Abbildung 10). Es muss somit eine hinreichende Verdunstungs- bzw. Abkühlungsrate vorliegen, welche diesen Phasenübergang gewährleistet (Doshi und Reneker 1995).

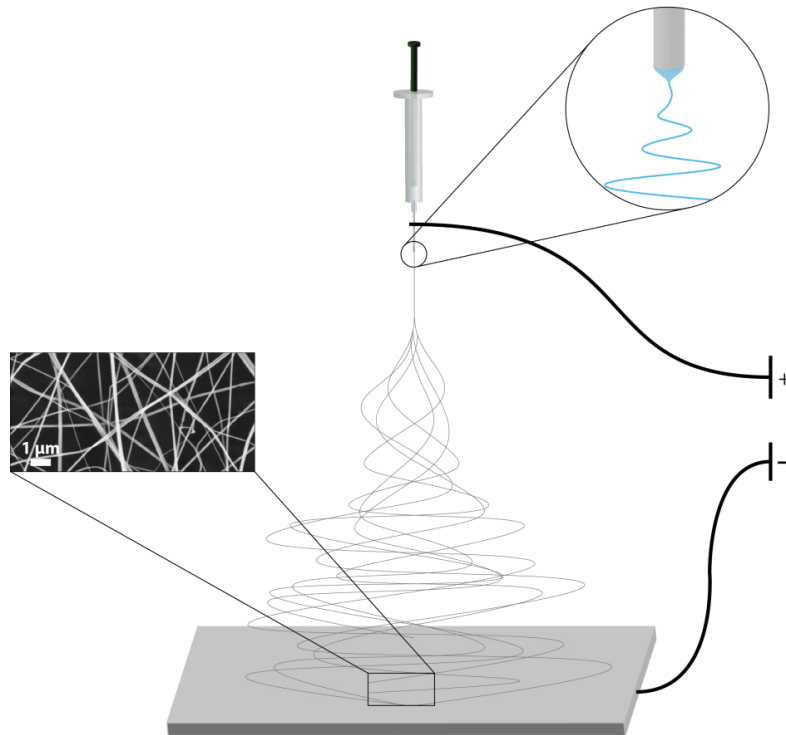


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Elektrosinnens. Eine mit einem Polymer befüllte Spritzenkanüle wird einem elektrischen Feld ausgesetzt, Kanüle und Kollektorplatte fungieren hierbei als Elektroden. Das elektrische Feld induziert die Bildung eines Taylor-Konus an der Kanülenspitze (Vergrößerung des runden Bereichs), aus dem sich ein gleichmäßiger Polymerfluss bildet (blaue Linie). Während der Polymerstrahl das elektrische Feld passiert, erfolgt der Phasenübergang, sodass das Polymer in Form eines festen Vliesstoffs auf die Kollektorplatte auftrifft. Die Vergrößerung des rechteckigen Bereichs zeigt die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines exemplarischen Vliesstoffs.

Aufgrund der Vielzahl an Parametern, welche einen entscheidenden Einfluss auf die genaue Morphologie des Vliesstoffes (Faserdurchmesser, Porengröße etc.) ausüben können, sind die optimalen Prozessparameter für ein bestimmtes Polymer praktisch nicht vorhersagbar und müssen daher empirisch evaluiert werden. Jedoch haben sich Polymerkonzentration und Viskosität als wichtige Parameter der Spinnlösung herausgestellt, über die ein vorzeitiger Strömungsabriss des Polymerstrahls vermieden werden kann, was ein ungewolltes Versprühen des Polymers begünstigen würde (Bhardwaj und Kundu 2010). Beide dieser Parameter veranschaulichen die Wichtigkeit der Verschlingung der Polymerketten ineinander während des Spinnprozesses, sodass ein konstanter Polymerstrahl entstehen kann. Verschiedene Seidenproteine konnten bereits zu Vliesstoffen elektroversponnen werden, jedoch bisher noch keine Seidenproteine der Fliege (Min, Jeong *et al.* 2006; Lang, Jokisch *et al.* 2013).

Wie bereits erwähnt, ist eine Nachbehandlung proteinbasierter Vliesstoffe nach dem Spinnen erforderlich, um sie in eine wasserunlösliche Form zu überführen. Zu diesem Zweck hat sich die Inkubation der Vliesstoffe in einer Lösungsmittelatmosphäre als effektive Behandlung her-

ausgestellt, sowohl wässrige als auch organische Lösungsmittel können hierfür geeignet sein (Min, Jeong *et al.* 2006; Lang, Jokisch *et al.* 2013). Die hierbei induzierten strukturellen Veränderungen innerhalb des Vliesstoffes können mit spektroskopischen Methoden wie die FTIR-Spektroskopie quantifiziert werden (Lang, Jokisch *et al.* 2013).

1.3.4 Seidenmaterialien in der Anwendung

1.3.4.1 Überblick über Einsatzmöglichkeiten von Seidenmaterialien

Aufgrund ihrer Biokompatibilität und hypoallergenen Eigenschaft erscheinen Seidenmaterialien als besonders geeignet für ihren Einsatz in der Biomedizin (Vollrath, Barth *et al.* 2002; Deptuch und Dams-Kozłowska 2017; DeSimone, Schacht *et al.* 2017). Beispielsweise können native Seidenfasern als chirurgisches Nahtmaterial zum Einsatz kommen (Altman, Diaz *et al.* 2003). Bezogen auf die Seide von *B. mori* ist zu diesem Zweck lediglich die vollständige Entfernung des Sericins eine notwendige Voraussetzung, da diese Klebproteine allergische Reaktionen auslösen können (Wen, Ye *et al.* 1990). Native Seidenfasern kommen auch im Bereich des *tissue engineering* zum Einsatz, hier dienen sie als Leitmaterial für Zellen des peripheren Nervensystems, damit diese nach einer Durchtrennung von Nervenbahnen wieder zusammenwachsen können (Kundu, Rajkhowa *et al.* 2013; Roloff, Strauss *et al.* 2014).

Hydrogele und Schäume sind weitere Morphologien aus Seidenproteinen, welche im Bereich des *tissue engineering* als Gerüstmaterial erforscht werden (Schacht und Scheibel 2011; Schacht, Vogt *et al.* 2016). Werden Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht in sphärische Seidenpartikel eingeschlossen, kann ihre kontrollierte Freisetzung über die genaue Partikelbeschaffenheit gesteuert werden, weshalb Partikel aus Seidenproteinen als vielversprechende Wirkstofftransportsysteme angesehen werden (Blüm und Scheibel 2012; Schacht und Scheibel 2014). Schließlich werden auch Filme und Beschichtungen unter anderem als antibakterielle Oberflächen oder als Implantatbeschichtungen erprobt (Kundu, Rajkhowa *et al.* 2013; Zepelin, Maksimovikj *et al.* 2014; Borkner, Wohlrab *et al.* 2017).

Aufgrund der mechanischen, chemischen sowie thermischen Stabilität sind Seidenmaterialien auch in den Fokus für technische Anwendungen geraten. Insbesondere mithilfe funktionalisierter Oberflächen können seidenbasierte Materialien mit wasserabweisenden oder flammhemmenden Eigenschaften hergestellt werden (Li, Liu *et al.* 2012). Bestehende Textilien können

nach einer Beschichtung mit aufgeschäumten Seidenlösungen bezüglich ihrer Abriebfestigkeit verbessert werden (Jokisch und Scheibel 2017). Des Weiteren wird der Einsatz seidenhaltiger Komposite in der Lebensmittelindustrie diskutiert (Doblhofer, Schmidt *et al.* 2016).

1.3.4.2 Einsatzmöglichkeiten von elektroversponnenen Seidenvliesstoffen

Elektroversponnene Seidenvliesstoffe werden unter anderem als mögliche Filtermaterialien getestet (Lang, Jokisch *et al.* 2013). Im Vergleich zu herkömmlichen Filtermaterialien ist für diese Vliesstoffe ein wesentlich geringerer Materialaufwand notwendig, um eine gleichwertige Filterleistung bei gleichzeitig höherer Energieeffizienz zu erzielen.

Vliesstoffe aus unterschiedlichen Seidenproteinen wurden bereits umfangreich auf ihre Eignung für unterschiedliche biomedizinische Anwendungen hin untersucht (Aigner, DeSimone *et al.* 2018). Aufgrund der Morphologie der im Vliesstoff enthaltenen Fasern können gewisse Parameter der extrazellulären Matrix nachgeahmt werden, wodurch die Zelladhäsion von Fibroblasten verbessert werden kann (Leal-Egana, Lang *et al.* 2012). Dies eröffnet Einsatzmöglichkeiten in der regenerativen Medizin, wie beispielsweise bei der Behandlung von Wunden. Vliesstoffe aus rekombinant hergestellten Seidenproteinen können außerdem zu Ersatzmaterial für Blutgefäße verarbeitet werden (Sell, Wolfe *et al.* 2010).

Des Weiteren können durch gleichzeitiges Verspinnen zweier Polymerlösungen Vliesstoffe produziert werden, deren Einzelfasern entweder eine Kern-Hülle-Struktur aufweisen oder in Form von Doppelfilamenten (Seite-an-Seite-Orientierung) vorliegen (Peng, Jiang *et al.* 2016). In dieser Anordnung ist unter Einsatz von unterschiedlichen Polymeren unter anderem ein System für kontrollierte Wirkstofffreisetzung denkbar.

In ihrer ursprünglichen Form ist das Elektrospinnenverfahren auf die Herstellung von zweidimensionalen Vliesstoffen beschränkt, jedoch wurden in der Literatur bereits dreidimensionale Vliesstoffe beschrieben (Cai, Xu *et al.* 2013). Neben Einsatzmöglichkeiten in der regenerativen Medizin sind für dieses ultraleichte Material auch technische Anwendungen denkbar, beispielsweise als Isolator oder als Filtermaterial (Duan, Jiang *et al.* 2015).

2 Zielsetzung

Die Weibchen vieler Florfliegenarten produzieren zum Zweck der Eiablage Eierstiele, an deren Enden sie einzelne Eier anheften, wodurch diese vor Fressfeinden geschützt sind. Charakteristische Strukturmerkmale der im Eierstiel enthaltenen Seidenproteinen sind bereits seit Jahrzehnten bekannt, jedoch wurden erst im Jahr 2009 die ersten und bisher einzigen Sequenzen von Eierstielproteinen publiziert, welche von der australischen Florfliege *Mallada signata* stammten (Weisman, Okada *et al.* 2009).

Mit der vorliegenden Arbeit sollte zunächst untersucht werden, inwieweit das Seidensystem der europäischen Florfliege *Chrysoperla carnea* dem Seidensystem der australischen Spezies ähnelt. In diesem Zusammenhang sollte eine Transkriptomanalyse des Gewebes der entsprechenden Spinndrüse auch aus projektstrategischer Sicht durchgeführt werden, da die auf diesem Wege identifizierten Gensequenzen im weiteren Verlauf einem Wirtsorganismus zum Zweck einer rekombinanten Proteinherstellung zugeführt werden können. Die rekombinante Herstellung von Proteinen besitzt den Vorteil, dass durch sie die entsprechenden Proteine in skalierbaren Mengen und in gleichbleibender Qualität bereitgestellt werden können.

Nach erfolgreicher Identifizierung von Seidenproteinen des Eierstiels aus *C. carnea* sollte sowohl eine Produktions- als auch eine Reinigungsstrategie für diese Proteine etabliert werden. Da Seidenproteine sehr häufig intrinsisch ungeordnete Proteine darstellen, sind diese Proteine meist einer Reinigungsstrategie mittels sequentieller selektiver Fällung zugänglich (Xia, Qian *et al.* 2010; Bauer und Scheibel 2012).

Die biochemischen Parameter, welche maßgeblich den natürlichen Spinnprozess der Florfliege bestimmen, sind bislang völlig unbekannt. Für andere Seidensysteme hat sich jedoch gezeigt, dass Erkenntnisse über Selbstassemblierungseigenschaften der beteiligten Seidenproteine maßgeblich zum Verständnis des natürlichen Spinnprozesses beitragen können (Hagn, Thamm *et al.* 2011; He, Zhang *et al.* 2012). Für ein besseres Verständnis des Spinnprozesses der Florfliege sollten daher in dieser Arbeit die rekombinant hergestellten Seidenproteine auf ihre jeweiligen Selbstassemblierungseigenschaften hin untersucht werden. Der methodische Schwerpunkt zur Bearbeitung dieser Fragestellung sollte hierbei auf spektroskopische (CD- und FTIR-Spektroskopie), kalorimetrische (DSC) sowie elektronenmikroskopische Methoden liegen.

In einem weiteren Teilprojekt sollte die Eignung von elektroversponnenen Fasermatten der Seidenproteine als Filtermaterial für Feinstaub evaluiert werden. Zu diesem Zweck sollten zunächst Nanovliesstoffe hergestellt und nachfolgend entsprechend präparierte Filterstoffe in einem normierten Feinstaubfiltertest mit Filterstoffen verglichen werden, welche mit Nanovliesstoffen aus Spinnenseidenprotein beziehungsweise aus synthetischen Polymeren präpariert wurden.

3 Synopsis

3.1 Molekularbiologische Studien

2009 wurden erstmals Sequenzen von Seidenproteinen des Eierstiels einer Florfliegenart publiziert, konkret handelt es sich hierbei um die Seidenproteine MalXB1 und MalXB2 der australischen Florfliege *Mallada signata* (Weisman, Okada *et al.* 2009). Seidenproteinsequenzen europäischer Florfliegenarten waren bislang jedoch unbekannt. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde das Transkriptom von *Chrysoperla carnea* mittels PCR auf Sequenzen hin analysiert, welche für Seidenproteine kodieren, die eine hohe Sequenzidentität zu den Proteinen des australischen Seidensystems aufweisen.

Mit dieser Strategie wurden zwei Seidenproteine identifiziert, welche im hohen Maße den Sequenzen von MalXB1 bzw. MalXB2 ähneln; diese identifizierten Proteine wurden ChryC1 und ChryC2 genannt (Teilarbeit I, Abbildungen S1 und S2). Für ChryC1 wurden zudem mehrere Transkriptvarianten identifiziert. ChryC1 weist, wie MalXB1, zwei repetitive Kerndomänen mit gegensätzlicher Nettoladung auf und besitzt ein Molekulargewicht von 78 kDa (siehe Abbildung 11). Die repetitiven Domänen werden unterbrochen von einer kurzen (48 Aminosäurereste langen) nichtrepetitiven Domäne. Der theoretische isoelektrische Punkt (IEP) von ChryC1 liegt bei 4,17.

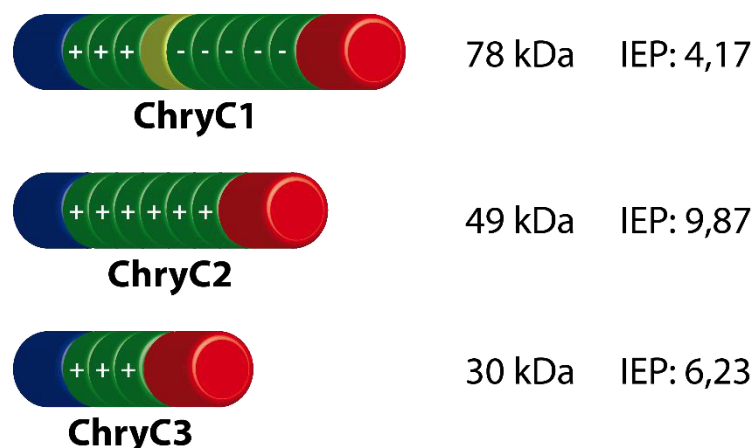


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Domänenarchitektur der Seidenproteine ChryC1, ChryC2 und ChryC3. Die repetitiven Sequenzbereiche (grün) werden bei ChryC1 von einer nichtrepetitiven Domäne (hellgrün) unterbrochen. Die positive bzw. negative Nettoladung der einzelnen Kerndomänen sind mit (+) bzw. (–) angegeben.

Zusätzlich zum Vollängenkonstrukt von ChryC1 konnten mehrere, teilweise stark verkürzte Transkriptvarianten identifiziert werden, welche ChryC1s1, ChryC1s2 usw. genannt wurden (Teilarbeit I, Abbildung S3). Erwähnenswert seien in diesem Zusammenhang Sequenzmerkmale der Transkriptvariante ChryC1s1: Als repetitive Einheit liegt lediglich der Großteil der ersten repetitiven Kerndomäne von ChryC1 vor, welche direkt in eine extrem verkürzte C-terminale Domäne übergeht (bestehend aus 8 Aminosäureresten). Letztere Domäne besteht lediglich aus einem Motiv von Aspartat-, Cystein- und Serinresten („DDSDDCSC“); dieses Motiv ist auch in allen restlichen identifizierten Transkriptvarianten enthalten, die sich ansonsten stark bezüglich ihrer C-terminalen Domänen unterscheiden. Alle identifizierten Transkriptvarianten von ChryC1 sind hingegen bezüglich ihrer N-terminalen Domäne komplett identisch.

ChryC2 weist, wie MalXB2, eine repetitive Kerndomäne mit positiver Nettoladung auf und besitzt ein Molekulargewicht von 49 kDa. Der theoretische IEP dieses Proteins liegt bei 9,87. Für ChryC2 konnten keine Transkriptvarianten ermittelt werden, was im Einklang mit den Ergebnissen von Weisman, Okada *et al.* 2009 steht.

Darüber hinaus wurde im Zuge der Transkriptomanalyse ein drittes Seidenprotein identifiziert, welches ChryC3 genannt wurde (siehe Abbildung 11 sowie Teilarbeit I, Abbildung 1). Dieses vergleichsweise kleine Protein (30 kDa) besitzt wie ChryC2 ebenfalls nur eine repetitive Kerndomäne mit positiver Nettoladung (theoretischer IEP = 6,23). Aufgrund eines detaillierten Sequenzvergleiches konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesem Protein lediglich um eine Transkriptvariante von ChryC1 oder ChryC2 handelt. Auch für dieses Protein konnten keine Transkriptvarianten identifiziert werden.

Bereits Weisman, Okada *et al.* 2009 haben zusätzlich zur Sequenzidentifizierung von Eierstielproteinen bei *M. signata* das Expressionsverhältnis von MalXB1 zu MalXB2 ermittelt, welches mit 7,7:1 angegeben wurde. Jedoch wurde dieses Verhältnis der Genexpression mit einer relativ hohen Standardabweichung angegeben ($\pm 3,5$). Außerdem geht aus dieser Studie nicht hervor, ob lediglich sehr kleine (max. 150 bp lange) cDNA-Sequenzbereiche vervielfältigt wurden, was nach aktuellem Wissensstand als ein entscheidendes Kriterium für eine aussagekräftigen Genexpressionsanalyse angesehen wird (Livak und Schmittgen 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden daher für die drei Seidenproteine ChryC1, ChryC2 und ChryC3 jeweils kurze Sequenzbereiche identifiziert (maximal 150 bp), welche sich sehr spezifisch mittels RT-qPCR vervielfältigen ließen. Zudem war für ChryC1 der entsprechende Sequenzbereich sowohl im Vollängenkonstrukt als auch in allen gefundenen Transkriptvarianten in identischer Form enthalten; hierdurch war gewährleistet, dass mit der Ermittlung der Genexpression von ChryC1 auch

alle bekannten Transkriptvarianten von ChryC1 mit erfasst wurden. Um den Beitrag dieser Transkriptvarianten an der gesamten Genexpression von ChryC1 zu veranschaulichen, wurde zusätzlich exemplarisch die Genexpression der Variante ChryC1s2 quantitativ ermittelt.

In der durchgeführten Analyse konnte für ChryC1 und ChryC2 ein Verhältnis der Genexpression von 5,5:1 ermittelt werden (siehe Abbildung 12 sowie Teilarbeit I). Normiert auf ChryC3 ergibt sich ein Verhältnis von 43:8:1; über 80% der gesamten Genexpression von Seidenproteinen entfällt demnach auf ChryC1, wobei der Beitrag der Transkriptvarianten als gering eingeschätzt werden kann: Die Genexpression von ChryC1s2 ist ähnlich niedrig wie jene von ChryC3 (siehe Abbildung 12).

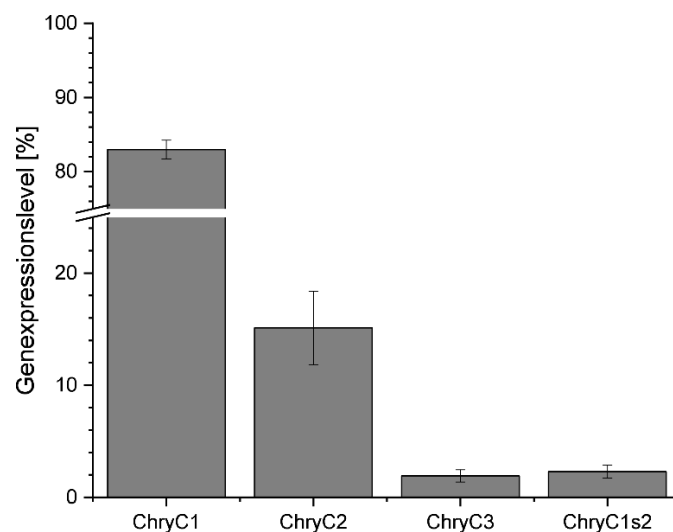


Abbildung 12: Normierte Expression der Gene, welche für die Seidenproteine ChryC1, ChryC2, ChryC3 sowie für die Transkriptvariante ChryC1s2 kodieren. Das mittlere Genexpressionsverhältnis von ChryC1:ChryC2:ChryC3 beträgt 43:8:1. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. Modifiziert nach Teilarbeit I, Abbildung 2.

3.2 Biotechnologische Herstellung von Seidenproteinen der Florfliege

In der vorliegenden Arbeit war zunächst eine rekombinante Herstellung von Seidenproteinen im analytischen Maßstab ausreichend, aus diesem Grund wurde auf die aufwendige Erstellung von *codon-usage*-optimierten Gensequenzen, welche den natürlichen Sequenzen von ChryC1, ChryC2 und ChryC3 entlehnt sind, verzichtet. Stattdessen wurden die natürlichen Voll-längenkonstrukte, welche für die drei Seidenproteine kodieren, direkt in bakterielle Expressionsvektoren (pET-System) kloniert, welche nachfolgend einem BL21-Bakterienstamm zugeführt wurden (Teilarbeit I).

Alle getesteten Fermentationstrategien, welche hohe Zelldichten beinhalteten ($OD_{600} > 30$), führten stets zu sehr geringen Ausbeuten, welche wahrscheinlich auf hohe Abbauraten des Zielproteins während der Induktionsphase zurückzuführen waren. Im Gegensatz dazu erwies sich eine Fermentationstrategie mit niedrigerer Zelldichte (OD_{600} zwischen 3 und 3,5) sowohl bezüglich Proteinqualität als auch Proteinausbeute als vorteilig. Nachfolgend ließen sich alle drei Seidenproteine jeweils mit einer sequentiellen selektiven Proteinfällung reinigen (Teilarbeit I). Da sich alle drei Seidenproteine als sehr hitzestabil erwiesen, wurde eine selektive Proteinfällung bei 80°C in die Reinigungsstrategie integriert, um bereits einen Großteil an *E.coli*-Proteinen vom Zielprodukt zu entfernen.

Eine Besonderheit stellte die Reinigung von ChryC2 dar: Im Gegensatz zu ChryC1 und ChryC3 zeigte ChryC2 keinerlei Tendenz, nach Zugabe einer beliebigen Menge an $(NH_4)_2SO_4$ zu präzipitieren. Aus diesem Grund wurde ChryC2 durch Zugabe von Aceton gefällt und anschließend per Harnstoffpuffer selektiv resolubilisiert (Teilarbeit I).

3.3 Studien über Eigenschaften der Selbstassemblierung von ChryC1, ChryC2 und ChryC3

Alle drei Seidenproteine wiesen in wässriger Lösung eine vorwiegend ungeordnete Proteinstruktur auf (*random coil*), wie zirkularspektroskopische Messungen ergaben (siehe Abbildung 13 sowie Teilarbeit I). Diese Strukturverteilung verschob sich nach Zugabe von Ethanol jeweils stark in Richtung von *beta*-Faltblattstrukturen. Für ChryC3 stellte dies die einzige Testbedingung dar, unter der eine Veränderung der Proteinstruktur induziert werden konnte. Erwähnenswert ist außerdem, dass sich bei ChryC1-Lösungen diese Strukturveränderung auch zusätzlich in der Entstehung von makroskopisch sichtbaren Fasern äußerte. REM-Untersuchungen ergaben, dass sich diese Fasern durch eine glatte Oberfläche sowie ein hohes Längen-Durchmesser-Verhältnis auszeichneten (Teilarbeit I, Abbildung 8).

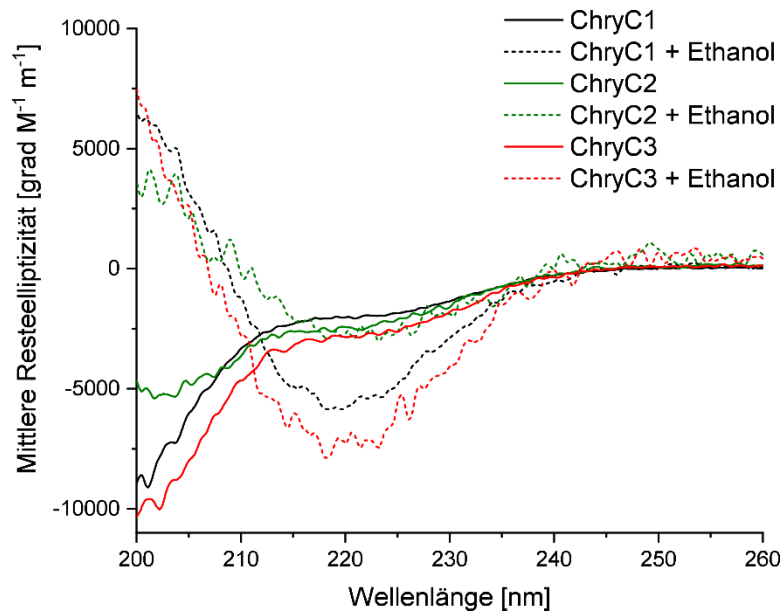


Abbildung 13: CD-Spektren der Proteine ChryC1, ChryC2 und ChryC3 in 10mM NH_4HCO_3 , nach bzw. ohne Zugabe von jeweils vier Volumina 100% Ethanol (p.a.). Modifiziert nach Teilarbeit I, Abbildung 4.

Für ChryC1 konnte eine *lower critical solution temperature* (LCST) von $27,3^\circ\text{C}$ ermittelt werden, oberhalb derer eine wässrige ChryC1-Lösung eine deutlich sichtbare Trübung annahm (Teilarbeit I, Abbildung 7). Dieses Verhalten erwies sich als komplett reversibel und könnte mit der grundlegenden Domänenarchitektur von ChryC1 erklärt werden, welche unter anderem zwei repetitive Kerndomänen mit entgegengesetzter Nettoladung aufweist. Diese Kerndomänen werden in wässriger Lösung möglicherweise durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Da diese Art der Bindungen thermisch instabil ist, entfällt unter erhöhten Temperaturen dieser Stabilisierungseffekt, was zu Neuansordnungen zwischen den Proteinmolekülen führt. Diese neuen zwischenmolekularen Interaktionen äußern sich makroskopisch in einer Eintrübung der Proteinlösung.

Es bleibt unklar, inwieweit das LCST-Verhalten von ChryC1 eine Rolle beim natürlichen Spinnprozess des Eierstiels spielt. Unter Laborbedingungen konnte sich diese Proteineigenschaft zumindest nicht zunutze gemacht werden, um unter rein wässrigen Bedingungen einen Phasenübergang zur Proteinfaser zu induzieren. Dies gilt sowohl für reine ChryC1-Lösungen als auch für Lösungen aus einem ChryC1-ChryC2-Gemisch mit einem molaren Verhältnis, welches ihrem natürlichen Genexpressionsverhältnis von 5,5:1 entsprach.

Für ChryC1 konnte eine weitere äußerst bemerkenswerte Eigenschaft zur Selbstassemblierung beobachtet werden: Wurde die Proteinkonzentration einer wässrigen ChryC1-Lösung per Dialyse gegen einen polyethylenglycolhaltigen Puffer erhöht, so assemblierte ChryC1 zu

Filmstrukturen mit glatter Oberfläche und äußerst gleichmäßiger Dicke (Teilarbeit I, Abbildung 5). Mittels FTIR-Messungen konnten für diese Filme ein *beta*-Faltblattanteil von knapp 50% ermittelt werden, ohne dass die Filme einer Nachbehandlung z.B. durch organische Lösungsmittel ausgesetzt werden mussten. Es konnte zudem ausgeschlossen werden, dass dieser Strukturanteil durch Trocknungseffekte innerhalb des Films hervorgerufen wurde, da FTIR-Messungen von nassen Filmen, bei denen das Wasser durch deuteriertes Wasser ausgetauscht wurde, praktisch identische Werte ergaben (Teilarbeit I, Tabelle 1 sowie Abbildung S6). Im Zuge dieser Arbeit konnte nicht weiter ermittelt werden, inwieweit das Material der Dialysemembran (bestehend aus regenerierter Cellulose) einen Einfluss auf diesen Assemblierungsprozess hat.

Wässrige ChryC2-Lösungen ließen sich nur mäßig konzentrieren, da ab einer Proteinkonzentration von ca. 1 mg/ml entsprechende Lösungen eine starke Neigung zur Hydrogelbildung aufwiesen. TEM-Untersuchungen ergaben, dass diese Hydrogele auf die Präsenz von Nanofibrillen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 5 nm zurückzuführen sind (Teilarbeit I, Abbildung 6). Diese Nanofibrillen wiesen einen hohen Anteil an *beta*-Faltblattstrukturen auf, wie zirkularspektroskopische Messungen ergaben (Teilarbeit I, Abbildung S5).

Die vorliegende Arbeit stellt die erste Studie bezüglich der Assemblierungseigenschaften der Seidenproteine aus dem Eierstiel der europäischen Florfliege dar. Die gewonnenen Erkenntnisse über die Eigenschaften der einzelnen Proteine sollen dabei helfen, zukünftig den natürlichen Spinnprozess in einem wässrigen System labortechnisch nachahmen zu können. Grundsätzlich erscheint es als große Herausforderung, im Zuge einer kontrollierten Selbstassemblierung zur Faser aus einem Proteingemisch das unkontrollierte Aggregieren einzelner Seidenkomponenten (namentlich ChryC2) zu vermeiden. In diesem Zusammenhang konnte bislang lediglich evaluiert werden, dass die Spinnparameter, die für Seidensysteme der Webspinnen bzw. des Seidenspinners als entscheidend erkannt wurden (Änderung des pH sowie der Konzentration kosmotroper Salze), ohne Bedeutung für den natürlichen Spinnprozess von Florfliegen-seide zu sein scheinen.

3.4 Verarbeitungen von Seidenproteinen zu Vliesstoffen

3.4.1 Herstellung von elektroversponnenen Fasern

In der Literatur sind bereits mehrfach elektroversponnene Vliesstoffe aus sowohl synthetischen Polymeren, als auch aus unterschiedlichen Seidenproteinen beschrieben (Gupta, Elkins *et al.* 2005; Zhou, Peng *et al.* 2008; Lang, Jokisch *et al.* 2013). Typischerweise können Polymere mit

diesem Verfahren zu Fasern mit einem Durchmesser im Submikrometerbereich versponnen werden. Im Zuge dieser Arbeit wurde ChryC1 per Elektrosponnverfahren zu Vliesstoffen verarbeitet. ChryC1 repräsentiert zum einen das Protein, dessen Gen gemäß unseren Studien mit Abstand am stärksten in der Spinndrüse der Florfliege exprimiert wird. Außerdem verspricht es im Vergleich zu den anderen Seidenproteinen des Eierstiels aufgrund seiner Molekülgröße einen maximalen Grad an intermolekularen Wechselwirkungen während des Elektrosponnprozesses, was die Aussichten auf einen stabilen Spinnprozess erhöhen (Gupta, Elkins *et al.* 2005).

Zwar ließ sich ChryC1 in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) lösen, jedoch ließ sich das Protein nicht innerhalb des Parameterregimes elektroverspinnen, welche bereits für den Elektrosponnprozess von Spinnenseidenproteinen wie eADF4(C16) etabliert werden konnten (Lang, Jokisch *et al.* 2013). Neben einer Anpassung der elektrischen Feldstärke war unter anderem auch eine niedrige relative Luftfeuchtigkeit von 30% eine notwendige Voraussetzung für einen stabilen Taylor-Konus während des Spinnprozesses (Teilarbeit II). Gesponnen wurde stets auf ein Polyamid-Gewebe als Trägermaterial, die eingesetzte Proteinkonzentration sowie die Belegungsdichte war hingegen variabel (siehe Abschnitt 3.4.2).

Aufgrund des hohen Anteils an *random coil* Strukturen sind elektroversponnene Seidenvliesstoffe grundsätzlich instabil gegenüber wässrigen Lösungsmitteln (Min, Jeong *et al.* 2006). Durch gewisse Nachbehandlungsmethoden kann jedoch der kristalline Anteil im Vliesstoff deutlich erhöht werden, was mit einer Beständigkeit gegenüber wässrigen Lösungsmitteln einhergeht. Diese Eigenschaft stellt eine notwendige Voraussetzung für technische Einsatzmöglichkeiten von Seidenvliesstoffen dar.

Eine Nachbehandlung durch Bedampfung mit Ethanol, wie sie bereits für elektroversponnene Vliesstoffe aus dem rekombinant hergestellten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) etabliert wurde, hat sich für Vliesstoffe aus ChryC1 als ungeeignet erwiesen, da dieses organische Lösungsmittel die morphologische Intaktheit der Fasern mindert. Stattdessen hat sich für diese Vliesstoffe eine Nachbehandlung mittels gesättigter Wasserdampfathmosphäre bei 30°C als Methode der Wahl herausgestellt, um kristalline Strukturen im Seidenvliesstoff zu induzieren. Das Prinzip dieser Nachbehandlungsmethode wurde bereits für Elektrosponnverfahren anderer Seidenproteine etabliert (Min, Jeong *et al.* 2006). FTIR-Messungen mit anschließender FSD-Analyse ergaben, dass sich mithilfe dieser Nachbehandlung der Anteil an *beta*-Faltblattstrukturen von ca. 10% auf ca. 40-45% erhöhte (unveröffentlichte Daten). Mittels REM wurde die Homogenität der Vliesstoffe überprüft. Abhängig von der Proteinkonzentration der Spinnlösung konnten Fasern mit einem Durchmesser zwischen 50 und 450 nm elektroversponnen werden (Teilarbeit II, Abbildung 1).

3.4.2 Seidenbasierte Vliesstoffe als Filtermaterial

Elektroverspinnene Seidennanofasern zeigen eine Kombination von Festigkeit und Dehnbarkeit (Lang, Jokisch *et al.* 2013). Vor dem Hintergrund, dass Feinstaub durch gewisse Abscheidungsprozesse besonders gut von Fasermaterialien abgefangen werden können, die einen Faserdurchmesser in der gleichen Größenordnung wie die Partikeldurchmesser des Feinstaubes besitzen, erscheint es naheliegend, entsprechende Nanofasern zur Verstärkung von herkömmlichen Filtermaterialien zu verwenden (Andrady 2008). Die Eignung von Vliesstoffen aus dem Spinnenseidenprotein eADF4(C16) zur Abscheidung von Feinstaub ist bereits in der Literatur beschrieben (Lang, Jokisch *et al.* 2013). Hierbei zeigte sich bereits, dass lediglich ein verhältnismäßig geringer Materialeinsatz an Seidenprotein notwendig ist, um zufriedenstellende Abscheidungsraten zu erzielen. Dabei offenbarte sich ein Vorteil von Seidenvliesstoffen als Filtermaterial, dass nämlich die Filterleistung mit nur einem geringen Druckabfall während des Filtriervorganges einhergeht, was sich wiederum positiv auf die Energiebilanz des Filterprozesses auswirkt.

Im Zuge dieser Arbeit wurden elektroverspinnene Vliesstoffe aus ChryC1 auf ihre Eignung als Filtermaterial für Feinstaub hin untersucht (Teilarbeit II). Zu diesem Zweck wurden ChryC1-Lösungen mit drei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen versponnen, was jeweils Vliesstoffe mit einem durchschnittlichen Faserdurchmesser von ca. 80, 200 bzw. 400 nm ergab. Diese drei Modifikationen wurden außerdem jeweils in vier unterschiedlichen Belegungsdichten angefertigt (40, 100, 150 bzw. 210 mg Protein pro Quadratmeter Filterfläche). Um die Filtereigenschaften dieses Vliesstoffes mit anderen Filtermaterialien vergleichen zu können, wurden mit dieser Parametermatrix auch Vliesstoffe aus dem rekombinant hergestellten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) sowie aus den synthetischen Materialien Polyethylenglycol und Polylaktid elektroversponnen. Für den Filtertest wurde Feinstaub gemäß der ISO-Norm 12103-1 verwendet (Teilarbeit II). Die genaue Größe des abgelagerten Feinstaubes konnte in vier Partikelgrößenkategorien differenziert detektiert werden (mit einem mittleren Durchmesser von 0,2; 0,8; 3,2 bzw. 8,9 μm).

Bei höheren Belegungsdichten wiesen Vliesstoffe aus ChryC1 Abscheidungsraten an Partikeln auf, welche vergleichbar mit denen von Vliesstoffen aus eADF4(C16) waren (siehe Tabelle 2). Diese Filterleistung konnte jedoch bei höherer Luftdurchlässigkeit und somit niedrigerem Druckverlust erzielt werden. Bei niedrigen Belegungsdichten verringerten sich allerdings die Abscheidungsraten von Vliesstoffen aus ChryC1, insbesondere bezüglich kleiner Partikelgrößen.

Tabelle 2: Filtrationseffizienz von elektroversponnenen Vliesstoffen aus Polylaktid, Polyethylenglycol, eADF4(C16) und ChryC1 mit einem durchschnittlichen Faserdurchmesser von jeweils maximal 250 nm. Der Druckverlust Δp wurde aus der Druckdifferenz zwischen sauberem Filter und feinstaubbeladenem Filter bestimmt. Modifiziert nach Teilarbeit II, Tabellen 1-3, mit freundlicher Genehmigung des Verlages WILEY-VCH.

Material		Polylaktid				Polyethylenglycol				eADF4(C16)				ChryC1			
Mittlerer Faserdurchmesser [nm]		200 < x < 250				200 < x < 250				150 < x < 250				150 < x < 250			
Belegungsdichte [mg m ⁻²]		40	100	150	210	40	100	150	210	40	100	150	210	40	100	150	210
Schichtdicke [μm]		99	247	371	519	63	158	237	332	31	78	117	163	38	94	142	198
Berechnete Anzahl an Fasernetzschichten		440	1100	1649	2308	281	703	1054	1475	138	345	518	725	168	419	629	880
Luftdurchlässigkeit [L m ⁻² s ⁻¹]		2761	2486	1671	1091	2790	2455	2077	1430	1274	579	349	238	1710	1326	1107	877
Abscheidungsrate	Ret _{0,2} [%]	28	43	51	86	13	16	51	22	69	92	99	100	53	66	78	88
	Ret _{0,8} [%]	25	45	51	92	14	15	21	29	86	99	100	100	68	87	94	98
	Ret _{3,2} [%]	41	62	73	98	17	32	36	48	97	100	100	100	89	95	98	99
	Ret _{8,9} [%]	65	78	88	100	45	54	55	74	99	100	100	100	96	96	98	99
Druckabfall [Pa]		116	127	129	193	23	30	34	40	128	241	286	453	96	196	227	320

REM-Untersuchungen deuteten darauf hin, dass ChryC1-Vliesstoffe weniger anfällig für das Verrutschen von Einzelfasern (*filter slippage*) zu sein scheinen, da sich im Zuge der Nachbehandlung der nativen Vliesstoffe durch Wasserdampf eine physikalische Quervernetzung der Fasern vollzogen hat. Dieser Umstand äußerte sich in besseren Abscheidungsraten von Feinstaub im Vergleich zu Vliesstoffen aus synthetischem Filtermaterial (siehe Tabelle 2). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Teilarbeit einen systematischen Vergleich von elektroversponnenen Vliesstoffen aus verschiedenen Polymeren bezüglich ihrer Eignung als Filtermaterial für die Abscheidung von Feinstaub.

4 Literaturverzeichnis

- Aigner, T. B., E. DeSimone und T. Scheibel (2018). "Biomedical Applications of Recombinant Silk-Based Materials." *Advanced Materials* **30**(19): e1704636.
- Altman, G. H., F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond und D. L. Kaplan (2003). "Silk-based biomaterials." *Biomaterials* **24**(3): 401-416.
- Andrady, A. L. (2008). *Applications of Nanofiber Mats. Science and Technology of Polymer Nanofibers*, Wiley & Sons, Inc. **1**: 225-242.
- Ashton, N. N., D. R. Roe, R. B. Weiss, T. E. Cheatham, 3rd und R. J. Stewart (2013). "Self-tensioning aquatic caddisfly silk: Ca^{2+} -dependent structure, strength, and load cycle hysteresis." *Biomacromolecules* **14**(10): 3668-3681.
- Ashton, N. N., D. S. Taggart und R. J. Stewart (2012). "Silk tape nanostructure and silk gland anatomy of trichoptera." *Biopolymers* **97**(6): 432-445.
- Ball, P. (2011). "Material witness: Trouble on the silk road." *Nature materials* **10**(1): 4.
- Bates, F. S. und G. H. Fredrickson (1990). "Block copolymer thermodynamics: theory and experiment." *Annual review of physical chemistry* **41**: 525-557.
- Bates, F. S., W. W. Maurer, P. M. Lipic, M. A. Hillmyer, K. Almdal, K. Mortensen, G. H. Fredrickson und T. P. Lodge (1997). "Polymeric bicontinuous microemulsions." *Physical Review Letters* **79**(5): 849-852.
- Bauer, F., L. Bertinetti, A. Masic und T. Scheibel (2012). "Dependence of mechanical properties of lacewing egg stalks on relative humidity." *Biomacromolecules*.
- Bauer, F. und T. Scheibel (2012). "Artificial egg stalks made of a recombinantly produced lacewing silk protein." *Angew Chem Int Ed Engl* **51**(26): 6521-6524.
- Bhardwaj, N. und S. C. Kundu (2010). "Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique." *Biotechnology advances* **28**(3): 325-347.
- Blüm, C. und T. Scheibel (2012). "Control of Drug Loading and Release Properties of Spider Silk Sub-Microparticles." *BioNanoScience* **2**(2): 67-74.
- Bon, M. (1710). "A Discourse upon the Usefulness of the Silk of Spiders." *Philosophical Transactions* **27**(325-336): 2-16.
- Borkner, C. B., S. Wohlrab, E. Moller, G. Lang und T. Scheibel (2017). "Surface Modification of Polymeric Biomaterials Using Recombinant Spider Silk Proteins." *Acs Biomaterials Science & Engineering* **3**(5): 767-775.
- Burmeister, S. (2000). "Geschlecht, Alter und Herrschaft in der Späthallstattzeit Württembergs." *Tübinger Schriften zur Ur- und Frühgeschichtlichen Archäologie* **4**: 140.
- Cai, S., H. Xu, Q. Jiang und Y. Yang (2013). "Novel 3D electrospun scaffolds with fibers oriented randomly and evenly in three dimensions to closely mimic the unique architectures of extracellular matrices in soft tissues: fabrication and mechanism study." *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **29**(7): 2311-2318.

- Church, J. S., A. L. Woodhead, A. A. Walker und T. D. Sutherland (2013). "A comparison of convergently evolved insect silks that share beta-sheet molecular structure." *Biopolymers*.
- Craig, C. L. (1997). "Evolution of arthropod silks." *Annu Rev Entomol* **42**: 231-267.
- Crick, F. H. und A. Rich (1955). "Structure of polyglycine II." *Nature* **176**(4486): 780-781.
- Deptuch, T. und H. Dams-Kozłowska (2017). "Silk Materials Functionalized via Genetic Engineering for Biomedical Applications." *Materials* **10**(12).
- DeSimone, E., K. Schacht, A. Pellert und T. Scheibel (2017). "Recombinant spider silk-based bioinks." *Biofabrication* **9**(4): 044104.
- Doblhofer, E., J. Schmidt, M. Riess, M. Daab, M. Suntinger, C. Habel, H. Bargel, C. Hugenschmidt, S. Rosenfeld, J. Breu und T. Scheibel (2016). "Structural Insights into Water-Based Spider Silk Protein-Nanoclay Composites with Excellent Gas and Water Vapor Barrier Properties." *ACS applied materials & interfaces* **8**(38): 25535-25543.
- Doshi, J. und D. H. Reneker (1995). "Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers." *Journal of Electrostatics* **35**(2-3): 151-160.
- Duan, G. G., S. H. Jiang, V. Jerome, J. H. Wendorff, A. Fathi, J. Uhm, V. Altstadt, M. Herling, J. Breu, R. Freitag, S. Agarwal und A. Greiner (2015). "Ultralight, Soft Polymer Sponges by Self-Assembly of Short Electrospun Fibers in Colloidal Dispersions." *Advanced Functional Materials* **25**(19): 2850-2856.
- Duelli, P. (1986). "A Missing Link in the Evolution of the Egg Pedicel in Lacewings." *Experientia* **42**(6): 624-624.
- Elias, H.-G. (2009a). *Mesophasen. Makromoleküle*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. **2**: 235-267.
- Elias, H.-G. (2009b). *Thermodynamik von Polymerlösungen. Makromoleküle*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. **2**: 292-362.
- Exler, J. H., D. Hummerich und T. Scheibel (2007). "The amphiphilic properties of spider silks are important for spinning." *Angewandte Chemie* **46**(19): 3559-3562.
- Fahnestock, S. R. und L. A. Bedzyk (1997). "Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*." *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**(1): 33-39.
- Flory, P. J. (1956). "Phase Equilibria in Solutions of Rod-Like Particles." *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences* **234**(1196): 73-89.
- Freddi, G., G. Pessina und M. Tsukada (1999). "Swelling and dissolution of silk fibroin (*Bombyx mori*) in N-methyl morpholine N-oxide." *International journal of biological macromolecules* **24**(2-3): 251-263.
- Fredrickson, G. H. und F. S. Bates (1996). "Dynamics of block copolymers: Theory and experiment." *Annual Review of Materials Science* **26**: 501-550.
- Fredrickson, G. H. und F. S. Bates (1997). "Design of bicontinuous polymeric microemulsions." *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* **35**(17): 2775-2786.

- Fried, J. R. (2003). Conformation, Solutions, and Molecular Weight. Polymer Science and Technology, Prentice Hall Professional Technical Reference: 87-151.
- Geddes, A. J., K. D. Parker, E. D. T. Atkins und E. Beighton (1968). "Cross-Beta Conformation in Proteins." Journal of Molecular Biology **32**(2): 343-&.
- Goldsmith, M. R., T. Shimada und H. Abe (2005). "The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*." Annual review of entomology **50**: 71-100.
- Gong, Y., L. Li, D. Gong, H. Yin und J. Zhang (2016). "Biomolecular Evidence of Silk from 8,500 Years Ago." PLoS One **11**(12): e0168042.
- Good, I. L., J. M. Kenoyer und R. H. Meadow (2009). "New Evidence for Early Silk in the Indus Civilization." Archaeometry **51**: 457-466.
- Gosline, J. M., P. A. Guerette, C. S. Ortlepp und K. N. Savage (1999). "The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function." The Journal of experimental biology **202**(Pt 23): 3295-3303.
- Gupta, P., C. Elkins, T. E. Long und G. L. Wilkes (2005). "Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent." Polymer **46**(13): 4799-4810.
- Hagn, F., C. Thamm, T. Scheibel und H. Kessler (2011). "pH-dependent dimerization and salt-dependent stabilization of the N-terminal domain of spider dragline silk--implications for fiber formation." Angewandte Chemie **50**(1): 310-313.
- Hardy, J. G., L. M. Romer und T. R. Scheibel (2008). "Polymeric materials based on silk proteins." Polymer **49**(20): 4309-4327.
- He, Y. X., N. N. Zhang, W. F. Li, N. Jia, B. Y. Chen, K. Zhou, J. Zhang, Y. Chen und C. Z. Zhou (2012). "N-Terminal domain of *Bombyx mori* fibroin mediates the assembly of silk in response to pH decrease." Journal of Molecular Biology **418**(3-4): 197-207.
- Heidebrecht, A., L. Eisoldt, J. Diehl, A. Schmidt, M. Geffers, G. Lang und T. Scheibel (2015). "Biomimetic Fibers Made of Recombinant Spidroins with the Same Toughness as Natural Spider Silk." Advanced Materials.
- Heidebrecht, A. und T. Scheibel (2013). "Recombinant Production of Spider Silk Proteins." Advances in Applied Microbiology, Vol 82 **82**: 115-153.
- Heim, M., L. Römer und T. Scheibel (2010). "Hierarchical structures made of proteins. The complex architecture of spider webs and their constituent silk proteins." Chemical Society Reviews **39**(1): 156-164.
- Hepburn, H. R., H. D. Chandler und M. R. Davidoff (1979). "Extensometric Properties of Insect Fibroins - Green Lacewing Cross-Beta, Honeybee Alpha-Helical and Greater Waxmoth Parallel-Beta Conformations." Insect Biochemistry **9**(1): 69-77.
- Hepburn, H. R. und S. P. Kurstjens (1988). "The Combs of Honeybees as Composite-Materials." Apidologie **19**(1): 25-36.
- Hofer, M., G. Winter und J. Myschik (2012). "Recombinant spider silk particles for controlled delivery of protein drugs." Biomaterials **33**(5): 1554-1562.

- Hohman, M. M., M. Shin, G. Rutledge und M. P. Brenner (2001). "Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory." *Physics of Fluids* **13**(8): 2201-2220.
- Humenik, M. und T. Scheibel (2014). "Self-assembly of nucleic acids, silk and hybrid materials thereof." *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal* **26**(50): 503102.
- Iizuka, E. (1985). "Silk Thread - Mechanism of Spinning and Its Mechanical-Properties." *Applied Polymer Symposia*(41): 173-185.
- Iizuka, E. (1988). "Properties of the liquid crystals of some biopolymers." *Advances in biophysics* **24**: 1-56.
- Jaffe, M., P. Chen, E. W. Choe, T. S. Chung und S. Makhija (1994). "High-Performance Polymer Blends." *High Performance Polymers* **117**: 297-327.
- Jenkins, A. D., P. Kratochvíl, R. F. T. Stepto und U. W. Suter (1996). Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996). *Pure and Applied Chemistry*. **68**: 2287.
- Jin, H. J., S. V. Fridrikh, G. C. Rutledge und D. L. Kaplan (2002). "Electrospinning Bombyx mori silk with poly(ethylene oxide)." *Biomacromolecules* **3**(6): 1233-1239.
- Jin, H. J. und D. L. Kaplan (2003). "Mechanism of silk processing in insects and spiders." *Nature* **424**(6952): 1057-1061.
- Jokisch, S. und T. Scheibel (2017). Spider silk foam coating of fabric. *Pure and Applied Chemistry*. **89**: 1769.
- Kaplan, D. L. und T. Scheibel (2017). Recombinant Silk Production in Bacteria.
- Kerkam, K., C. Viney, D. Kaplan und S. Lombardi (1991). "Liquid Crystallinity of Natural Silk Secretions." *Nature* **349**(6310): 596-598.
- Kirkitadze, M. D., M. M. Condrón und D. B. Teplow (2001). "Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid beta-protein fibrillogenesis." *Journal of Molecular Biology* **312**(5): 1103-1119.
- Koningsveld, R., L. A. Kleintjens und H. M. Schoffeleers (1974). "Thermodynamic Aspects of Polymer Compatibility." *Pure and Applied Chemistry* **39**(1-2): 1-32.
- Kronenberger, K., C. Dicko und F. Vollrath (2012). "A novel marine silk." *Naturwissenschaften* **99**(1): 3-10.
- Kundu, B., R. Rajkhowa, S. C. Kundu und X. Wang (2013). "Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations." *Advanced drug delivery reviews* **65**(4): 457-470.
- Lammel, A., M. Schwab, U. Slotta, G. Winter und T. Scheibel (2008). "Processing conditions for the formation of spider silk microspheres." *Chemosuschem* **1**(5): 413-416.
- Lang, G., H. Herold und T. Scheibel (2017). "Properties of Engineered and Fabricated Silks." *Sub-cellular biochemistry* **82**: 527-573.

- Lang, G., S. Jokisch und T. Scheibel (2013). "Air filter devices including nonwoven meshes of electrospun recombinant spider silk proteins." *Journal of visualized experiments : JoVE*(75): e50492.
- Lanio, W., U. Swida und H. Kress (1994). "Molecular cloning of the *Drosophila virilis* larval glue protein gene Lgp-3 and its comparative analysis with other *Drosophila* glue protein genes." *Biochimica et biophysica acta* **1219**(2): 576-580.
- Leal-Egana, A., G. Lang, C. Mauerer, J. Wickinghoff, M. Weber, S. Geimer und T. Scheibel (2012). "Interactions of Fibroblasts with Different Morphologies Made of an Engineered Spider Silk Protein." *Advanced Engineering Materials* **14**(3): B67-B75.
- Li, G. H., H. Liu, T. D. Li und J. Y. Wang (2012). "Surface modification and functionalization of silk fibroin fibers/fabric toward high performance applications." *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications* **32**(4): 627-636.
- Lintz, E. S. und T. R. Scheibel (2013). "Dragline, Egg Stalk and Byssus: A Comparison of Outstanding Protein Fibers and Their Potential for Developing New Materials." *Advanced Functional Materials* **23**(36): 4467-4482.
- Livak, K. J. und T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Lucas, F., J. T. B. Shaw und S. G. Smith (1957). "Amino-Acid Composition of the Silk of *Chrysopa* Egg-Stalks." *Nature* **179**(4566): 906-907.
- Matsumoto, A., H. Kim, I. Tsai, X. Wang, P. Cebe und D. Kaplan (2007). *Silk*. Boca Raton, CRC/Taylor & Francis.
- Menassa, R., Z. Hong, C. N. Karatzas, A. Lazaris, A. Richman und J. Brandle (2004). "Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production." *Plant Biotechnology Journal* **2**(5): 431-438.
- Min, B. M., L. Jeong, K. Y. Lee und W. H. Park (2006). "Regenerated silk fibroin nanofibers: Water vapor-induced structural changes and their effects on the behavior of normal human cells." *Macromolecular bioscience* **6**(4): 285-292.
- Mittal, V. (2012). *Functional Polymer Blends: Synthesis, Properties, and Performance*.
- Mori, H. und M. Tsukada (2000). "New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials." *Journal of biotechnology* **74**(2): 95-103.
- Neuenfeldt, M. und T. Scheibel (2014). *Silks From Insects: From Natural Diversity to Applications*. Insect Molecular Biology and Ecology, CRC Press: 376-400.
- Neuenfeldt, M. und T. Scheibel (2017). "Sequence Identification, Recombinant Production, and Analysis of the Self-Assembly of Egg Stalk Silk Proteins from Lacewing *Chrysoperla carnea*." *Biomolecules* **7**(2).
- New, T. R. (2002). "Prospects for extending the use of Australian lacewings in biological control." *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **48**: 209-216.
- Parker, K. D. und K. M. Rudall (1957). "Structure of the Silk of *Chrysopa* Egg-Stalks." *Nature* **179**(4566): 905-906.

- Peng, L., S. H. Jiang, M. Seuss, A. Fery, G. Lang, T. Scheibel und S. Agarwal (2016). "Two-in-One Composite Fibers With Side-by-Side Arrangement of Silk Fibroin and Poly(L-lactide) by Electrospinning." *Macromolecular Materials and Engineering* **301**(1): 48-55.
- Porter, D. und F. Vollrath (2008). "The role of kinetics of water and amide bonding in protein stability." *Soft Matter* **4**(2): 328-336.
- Porter, D. und F. Vollrath (2009). "Silk as a Biomimetic Ideal for Structural Polymers." *Advanced Materials* **21**(4): 487-492.
- Priemel, T., E. Degtyar, M. N. Dean und M. J. Harrington (2017). "Rapid self-assembly of complex biomolecular architectures during mussel byssus biofabrication." *Nature communications* **8**: 14539.
- Prince, J. T., K. P. McGrath, C. M. DiGirolamo und D. L. Kaplan (1995). "Construction, cloning, and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk." *Biochemistry* **34**(34): 10879-10885.
- Qin, X. X., K. J. Coyne und J. H. Waite (1997). "Tough tendons - Mussel byssus has collagen with silk-like domains." *Journal of Biological Chemistry* **272**(51): 32623-32627.
- Richards, O. W. und R. G. Davies (1977). Psocoptera (Copeognatha, Corrodentia: Booklice or Psocids and their allies). *Imms' General Textbook of Entomology*. **2**: 646-657.
- Roloff, F., S. Strauss, P. M. Vogt, G. Bicker und C. Radtke (2014). "Spider Silk as Guiding Biomaterial for Human Model Neurons." *Biomed Research International*.
- Römer, L. und T. Scheibel (2007). "Spinnenseidenproteine: Grundlage für neue Materialien." *Chemie in unserer Zeit* **41**(4): 306-314.
- Roth, G. E., S. Wattler, H. Bornschein, M. Lehmann und G. Korge (1999). "Structure and regulation of the salivary gland secretion protein gene Sgs-1 of *Drosophila melanogaster*." *Genetics* **153**(2): 753-762.
- Schacht, K. und T. Scheibel (2011). "Controlled hydrogel formation of a recombinant spider silk protein." *Biomacromolecules* **12**(7): 2488-2495.
- Schacht, K. und T. Scheibel (2014). "Processing of recombinant spider silk proteins into tailor-made materials for biomaterials applications." *Current Opinion in Biotechnology* **29**: 62-69.
- Schacht, K., J. Vogt und T. Scheibel (2016). "Foams Made of Engineered Recombinant Spider Silk Proteins as 3D Scaffolds for Cell Growth." *Acs Biomaterials Science & Engineering* **2**(4): 517-525.
- Scheibel, T. (2004). "Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins." *Microbial cell factories* **3**(1): 14.
- Scheibel, T., H. Zahn und A. Krasowski (2016). Silk. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- Sehnal, F. und H. Akai (1990). "Insect Silk Glands - Their Types, Development and Function, and Effects of Environmental-Factors and Morphogenetic Hormones on Them." *International Journal of Insect Morphology & Embryology* **19**(2): 79-132.

- Sehna, F. und T. Sutherland (2008). "Silks produced by insect labial glands." *Prion* **2**(4): 145-153.
- Sehna, F. und M. Zurovec (2004). "Construction of silk fiber core in lepidoptera." *Biomacromolecules* **5**(3): 666-674.
- Seidel, A., O. Liivak, S. Calve, J. Adaska, G. D. Ji, Z. T. Yang, D. Grubb, D. B. Zax und L. W. Jelinski (2000). "Regenerated spider silk: Processing, properties, and structure." *Macromolecules* **33**(3): 775-780.
- Sell, S. A., P. S. Wolfe, K. Garg, J. M. McCool, I. A. Rodriguez und G. L. Bowlin (2010). "The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues." *Polymers* **2**(4): 522-553.
- Shao, Z. und F. Vollrath (2002). "Surprising strength of silkworm silk." *Nature* **418**(6899): 741.
- Spiess, K., A. Lammel und T. Scheibel (2010). "Recombinant spider silk proteins for applications in biomaterials." *Macromolecular bioscience* **10**(9): 998-1007.
- Stewart, R. J. und C. S. Wang (2010). "Adaptation of caddisfly larval silks to aquatic habitats by phosphorylation of h-fibroin serines." *Biomacromolecules* **11**(4): 969-974.
- Sutherland, T. D., S. Weisman, A. A. Walker und S. T. Mudie (2012). "Invited review the coiled coil silk of bees, ants, and hornets." *Biopolymers* **97**(6): 446-454.
- Sutherland, T. D., J. H. Young, S. Weisman, C. Y. Hayashi und D. J. Merritt (2010). "Insect silk: one name, many materials." *Annu Rev Entomol* **55**: 171-188.
- Tanaka, K., S. Inoue und S. Mizuno (1999). "Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*." *Insect biochemistry and molecular biology* **29**(3): 269-276.
- Ten Brinke, G., F. E. Karasz und W. J. MacKnight (1983). "Phase behavior in copolymer blends: poly (2, 6-dimethyl-1, 4-phenylene oxide) and halogen-substituted styrene copolymers." *Macromolecules* **16**(12): 1827-1832.
- Vendrely, C. und T. Scheibel (2007). "Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications." *Macromolecular bioscience* **7**(4): 401-409.
- Vollrath, F., P. Barth, A. Basedow, W. Engstrom und H. List (2002). "Local tolerance to spider silks and protein polymers in vivo." *In vivo* **16**(4): 229-234.
- Vollrath, F. und D. P. Knight (2001). "Liquid crystalline spinning of spider silk." *Nature* **410**(6828): 541-548.
- Walker, A. A., J. S. Church, A. L. Woodhead und T. D. Sutherland (2013). "Silverfish silk is formed by entanglement of randomly coiled protein chains." *Insect biochemistry and molecular biology*.
- Walker, A. A., S. Weisman, H. E. Trueman, D. J. Merritt und T. D. Sutherland (2015). "The other prey-capture silk: Fibres made by glow-worms (Diptera: Keroplatidae) comprise cross-beta-sheet crystallites in an abundant amorphous fraction." *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **187**: 78-84.

- Weisman, S., V. S. Haritos, J. S. Church, M. G. Huson, S. T. Mudie, A. J. Rodgers, G. J. Dumsday und T. D. Sutherland (2010). "Honeybee silk: recombinant protein production, assembly and fiber spinning." *Biomaterials* **31**(9): 2695-2700.
- Weisman, S., S. Okada, S. T. Mudie, M. G. Huson, H. E. Trueman, A. Sriskantha, V. S. Haritos und T. D. Sutherland (2009). "Fifty years later: the sequence, structure and function of lacewing cross-beta silk." *J Struct Biol* **168**(3): 467-475.
- Weisman, S., H. E. Trueman, S. T. Mudie, J. S. Church, T. D. Sutherland und V. S. Haritos (2008). "An unlikely silk: the composite material of green lacewing cocoons." *Biomacromolecules* **9**(11): 3065-3069.
- Wen, C. M., S. T. Ye, L. X. Zhou und Y. Yu (1990). "Silk-induced asthma in children: a report of 64 cases." *Annals of allergy* **65**(5): 375-378.
- Wohlrab, S., S. Muller, A. Schmidt, S. Neubauer, H. Kessler, A. Leal-Egana und T. Scheibel (2012). "Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins." *Biomaterials* **33**(28): 6650-6659.
- Wolf, B. A. (1972). *Zur Thermodynamik der enthalpisch und der entropisch bedingten Entmischung von Polymerlösungen. Fortschritte der Hochpolymeren-Forschung.* Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 109-171.
- Woolley, J. B. und L. E. M. Vet (1980). "Postovipositional Web-Spinning Behavior in a Hyperparasite, *Signiphora Coquilletti* Ashmead (Hymenoptera: Signiphoridae)." *Netherlands Journal of Zoology* **31**(3): 627-633.
- Wyniger, R. (1974). *Zuchtmethoden. Insektenzucht: Methoden der Zucht und Haltung von Insekten und Milben im Laboratorium,* Ulmer Verlag Stuttgart: 217.
- Xia, X. X., Z. G. Qian, C. S. Ki, Y. H. Park, D. L. Kaplan und S. Y. Lee (2010). "Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(32): 14059-14063.
- Zeplin, P. H., N. C. Maksimovikj, M. C. Jordan, J. Nickel, G. Lang, A. H. Leimer, L. Roemer und T. Scheibel (2014). "Spider Silk Coatings as a Bioshield to Reduce Periprosthetic Fibrous Capsule Formation." *Advanced Functional Materials* **24**(18): 2658-2666.
- Zhou, S., H. Peng, X. Yu, X. Zheng, W. Cui, Z. Zhang, X. Li, J. Wang, J. Weng, W. Jia und F. Li (2008). "Preparation and characterization of a novel electrospun spider silk fibroin/poly(D,L-lactide) composite fiber." *The journal of physical chemistry. B* **112**(36): 11209-11216.

5 Publikationsliste

- I. **Neuenfeldt, M.** and T. Scheibel (2017). "Sequence Identification, Recombinant Production, and Analysis of the Self-Assembly of Egg Stalk Silk Proteins from Lacewing *Chrysoperla carnea*". *Biomolecules*, 7(2), 43.
- II. Jokisch, S.; **Neuenfeldt, M.** and T. Scheibel (2017). "Silk-Based Fine Dust Filters for Air Filtration". *Advanced Sustainable Systems*, 1, 1700079.
doi: 10.1002/adsu.201700079.
- III. **Neuenfeldt, M.** and T. Scheibel (2014). "Silks from Insects - From Natural Diversity to Applications". *Insect Molecular Biology and Ecology*, CRC Press 2014, pp. 376-400.

Die Teilarbeiten I bis III sind nachfolgend angehängt.

6 Darstellung des Eigenanteils

- I. **Neuenfeldt, M.** and T. Scheibel (2017). "Sequence Identification, Recombinant Production, and Analysis of the Self-Assembly of Egg Stalk Silk Proteins from Lacewing *Chrysoperla carnea*". *Biomolecules*, 7(2), 43.

Die Konzeption des Artikels wurden von Thomas Scheibel und mir erarbeitet. Alle Experimente wurden von mir durchgeführt. Thomas Scheibel war in die wissenschaftliche Diskussion eingebunden. Das Manuskript wurde von mir geschrieben, an der Fertigstellung des Manuskripts war Thomas Scheibel beteiligt.

- II. Jokisch, S.; **Neuenfeldt, M.** and T. Scheibel (2017). "Silk-Based Fine Dust Filters for Air Filtration". *Advanced Sustainable Systems*, 1, 1700079.
doi: 10.1002/adsu.201700079.

Die Konzeption des Artikels wurden von Stephan Jokisch, Thomas Scheibel und mir erarbeitet. Die Fermentation und Reinigung von ChryC1 wurde von mir durchgeführt. Die rheologische Charakterisierung der Spinnlösungen sowie das Elektrosponnen wurden von Stephan Jokisch durchgeführt. Die Nachbehandlung der elektroversponnenen Vliesstoffe wurde von Stephan Jokisch und mir durchgeführt. Der Filtertest wurde von Stephan Jokisch durchgeführt. Die Messung der Luftdurchlässigkeit wurde von Stephan Jokisch und mir durchgeführt. Thomas Scheibel war in die wissenschaftliche Diskussion eingebunden. Das Manuskript wurde von Stephan Jokisch und mir geschrieben, an der Fertigstellung des Manuskripts war Thomas Scheibel beteiligt.

- III. **Neuenfeldt, M.** and T. Scheibel (2014). "Silks from Insects - From Natural Diversity to Applications". *Insect Molecular Biology and Ecology*, CRC Press 2014, pp. 376-400.

Die Konzeption des Artikels wurden von Thomas Scheibel und mir erarbeitet. Das Manuskript wurde von mir geschrieben. Thomas Scheibel war in wissenschaftliche Diskussionen eingebunden sowie an der Fertigstellung des Manuskripts beteiligt.

7 Teilarbeiten

7.1 Teilarbeit I

Der Inhalt dieses Kapitels wurden bereits in *Biomolecules* veröffentlicht als:

Neuenfeldt, M. and T. Scheibel (2017). "Sequence Identification, Recombinant Production, and Analysis of the Self-Assembly of Egg Stalk Silk Proteins from Lacewing *Chrysoperla carnea*".

Reproduziert aus: *Biomolecules*, 7(2), 43.

Die Rechte dieses Artikels liegen bei den Autoren Martin Neuenfeldt und Thomas Scheibel (2017). Unter Einhaltung der Bedingungen und Richtlinien von Creative Commons gemäß der Namensnennung 4.0 International (CC BY 4.0) ist die Reproduktion im Rahmen dieser Arbeit rechtmäßig. Lizenznehmer: MDPI, Basel, Schweiz.

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Die Reproduktion dieses Artikels erfolgt in vollständiger Form, der Artikel wurde nicht modifiziert. Der Originalartikel kann abgerufen werden unter:

<https://www.mdpi.com/2218-273X/7/2/43>

Article

Sequence Identification, Recombinant Production, and Analysis of the Self-Assembly of Egg Stalk Silk Proteins from Lacewing *Chrysoperla carnea*

Martin Neuenfeldt ¹ and Thomas Scheibel ^{1,2,3,4,5,6,*}

¹ Lehrstuhl Biomaterialien, Fakultät für Ingenieurwissenschaften, Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany; martin.neuenfeldt@bm.uni-bayreuth.de

² Forschungszentrum für Bio-Makromoleküle (BIOmac), Bayrisches Geoinstitut, Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

³ Bayreuther Materialzentrum (BayMat), Fakultät für Ingenieurwissenschaften, Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

⁴ Bayrisches Polymerinstitut (BPI), Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

⁵ Bayreuther Zentrum für Kolloide und Grenzflächen (BZKG), Universität Bayreuth, Naturwissenschaften I, 95440 Bayreuth, Germany

⁶ Bayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften (BZMB), Universität Bayreuth, Naturwissenschaften I, 95440 Bayreuth, Germany

* Correspondence: thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de; Tel.: +49-921-557-361

Academic Editor: Margaret Sunde, Matthew Chapman, Daniel Otzen and Sarah Perrett

Received: 10 April 2017; Accepted: 7 June 2017; Published: 13 June 2017

Abstract: Egg stalk silks of the common green lacewing *Chrysoperla carnea* likely comprise at least three different silk proteins. Based on the natural spinning process, it was hypothesized that these proteins self-assemble without shear stress, as adult lacewings do not use a spinneret. To examine this, the first sequence identification and determination of the gene expression profile of several silk proteins and various transcript variants thereof was conducted, and then the three major proteins were recombinantly produced in *Escherichia coli* encoded by their native complementary DNA (cDNA) sequences. Circular dichroism measurements indicated that the silk proteins in aqueous solutions had a mainly intrinsically disordered structure. The largest silk protein, which we named ChryC1, exhibited a lower critical solution temperature (LCST) behavior and self-assembled into fibers or film morphologies, depending on the conditions used. The second silk protein, ChryC2, self-assembled into nanofibrils and subsequently formed hydrogels. Circular dichroism and Fourier transform infrared spectroscopy confirmed conformational changes of both proteins into beta sheet rich structures upon assembly. ChryC3 did not self-assemble into any morphology under the tested conditions. Thereby, through this work, it could be shown that recombinant lacewing silk proteins can be produced and further used for studying the fiber formation of lacewing egg stalks.

Keywords: insect silk; qPCR; transcript variants; genome analysis; recombinant proteins; circular dichroism; self-assembly

1. Introduction

Oviposition, a unique egg laying behavior exhibited by most species of female lacewings, results in the production of an egg attached to an egg stalk comprised primarily of silk proteins [1]. Silk proteins are typically associated with arthropods, like silkworms or spiders; however lacewings have several interesting and unique aspects to their silk proteins and their processing. For example, in the case of most arthropods spinning a proper silk fiber requires the mechanical pulling of the silk out of a spinneret [2,3]. In contrast, a spinneret is absent in adult lacewings, and the spinning process of its

silk occurs completely outside of the animal's body. First, a droplet of silk dope is secreted, and then a fiber is drawn by lifting their abdomen out of the secreted droplet of silk dope. After subsequent deposition of an egg at the tip of the silk thread, they hold their lifted position for several seconds until the fiber has dried. The resulting egg stalk protects the egg from predators and cannibalism by lifting it from the ground until the larva hatches [1]. This key difference in silk processing, when comparing most arthropods to lacewing silk, indicates that some form of pre-assembly of the proteins in solution must occur. This makes lacewing silk a particularly interesting tool to study the self-assembly behavior of silk proteins.

Structural studies of lacewing egg stalk silk revealed a native cross-beta conformation [4]. The densely-stacked beta sheets are believed to contribute to the bending stiffness of the stalks. Further stretching of egg stalk fibers results in a structural conversion towards parallel beta sheets, which underlies the exceptional extensibility of this protein compared to other fibrous proteins [4,5]. The extent of this permanent non-elastic deformation depends significantly on the relative humidity, and has a maximum value of 380% [6]. There are few other examples of functional cross-beta structures, and this is likely due to the fact that these structures significantly increase the probability of non-triggered protein aggregation [6].

In previous studies on egg stalks from the endemic Australian species *Mallada signata* two major silk proteins, MalXB1 and MalXB2, were identified [6]. These proteins are rich in serine, glycine, and alanine residues, and both comprise repetitive core domains with a 16-residue periodicity, this periodicity giving rise to the cross-beta conformation [6].

Here we identified for the first time sequences of three egg stalk silk proteins and four transcript variants of the common European green lacewing *Chrysoperla carnea* and their natural gene expression pattern. Collecting natural silk in the amounts required to analyze individual silk proteins in more detail is a daunting task, and recombinant production of silk proteins is a popular, well-established and accepted alternative [7-9]. Therefore, all three identified proteins were recombinantly produced based on their natural sequence (complementary DNA) and characterized in solution. Two out of three proteins showed self-assembly properties into two- and three-dimensional morphologies which were structurally characterized in more detail.

2. Results

Although egg stalk silks from several lacewing species have been investigated in terms of amino acid composition and concerning structural properties of the fibers [4,10], protein sequence information is only available for two egg stalk proteins of the Australian species *M. signata* [6]. In order to evaluate sequence homologies of egg stalks to a related European member of the family Chrysopidae (Figure S7), silk-encoding complementary DNA (cDNA) sequences of *Chrysoperla carnea* were identified using primers based on nucleotide sequences of MalXB1 and MalXB2, respectively. We identified two sequences sharing high identity with MalXB1 and MalXB2, which we named ChryC1 (78.2 kDa; 78% sequence identity with MalXB1; Genbank accession no.: KY906176) and ChryC2 (48.7 kDa; 76% sequence identity with MalXB2; Genbank accession no.: KY906177) (Figures S1 and S2). The amino acid sequences of both proteins comprise repetitive core domains with a 16-residue periodicity, and, like MalXB1, ChryC1 shows two domains interrupted by a short, non-repetitive region. Additionally, four transcript variants of ChryC1 were identified by using the same primers as for the full-length construct (Figure S3).

The amino acid residues glycine, alanine, and serine are the most abundant residues in silk proteins in general. It is believed that the reason for this conservation is that the residues provide an intermediate hydrophobicity which facilitates the processing of the silk dope towards a fiber [11]. Therefore, we screened for additional putative silk-encoding cDNA sequences using short primers encoding for stretches of glycine, alanine or serine, respectively (Table S1). After identifying a novel sequence fragment which could not be assigned to ChryC1 or ChryC2, we sequenced the full-length cDNA encoding this putative silk protein using the template-switch method by which cDNA molecules of interest are being elongated with a predefined primer sequence at their 3' end in order to be amplified in a subsequent PCR [12]. The resulting protein, which we named ChryC3 (30.3 kDa;

Genbank accession no.: KY906178), shows a similar amino acid composition and the same 16-residue periodicity as the other known egg stalk proteins (Figure 1).

[illegible]

Figure 1. Amino acid sequence of ChryC3 (Genbank accession no.: KY906178). Italics: signal sequence, predicted by SignalP 4.1. Red marked amino acid residues: positions with detected single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the cDNA library: gct (Ala) → act (Thr). Green marked amino acid residue: silent SNP (tca → tcg).

Further, we identified the expression ratio between the individual sequences. In the last two decades, pivotal advances regarding sample preparation and analysis of quantitative PCR (qPCR) data have been established, rendering qPCR a highly sensitive method for the determination of gene expression levels [13,14]. For egg stalks of *M. signata*, a significantly higher expression of MalXB1 compared to MalXB2 was observed [6]. In order to determine the expression levels of egg stalk genes of *C. carnea*, qPCR primers were designed to bind to sequences encoding the N-terminal domain of the proteins. For ChryC1, this domain was unaltered in both full-length ChryC1 and all of its transcript variants. Thus, the respective qPCR product represented native ChryC1 and all known transcript variants (Figure S3). In one transcript variant of ChryC1 (namely ChryC1s2; Genbank accession no.: KY906180), the second repetitive domain is deleted. In order to analyze the relative expression level of ChryC1s2, the feature of the deleted domain was exploited on a nucleotide level to design primers which specifically amplify this shortened variant. Analysis of gene expression in colleterial glands showed that ChryC1 exhibited the highest gene expression level, followed by ChryC2 and ChryC3 (Figure 2). The expression level of the transcript variant ChryC1s2 was comparable to that of ChryC3. There was no detected expression of any egg stalk genes in male lacewing and, therefore, they acted as a negative control group in this experiment (Figure S4). To our best knowledge, this is the first quantification of transcript variants of lacewing silk by qPCR.

For recombinant protein production, the native nucleotide sequences encoding the three full-length egg stalk proteins were cloned into an *Escherichia coli* expression vector using a PCR cloning strategy. The advantage of this technique was there was no need for restriction enzymes to prepare the constructs [15]. Initially for ChryC1 a major drop in protein yield was observed at high cell density fermentation and, therefore, the fermentation conditions had to be adjusted to obtain the highest possible protein yield. Induction of gene expression at cell densities between OD_{600 nm} of 3.0 and 3.5 (for 4 h at 30 °C) led to the most effective production of protein with yields of up to 109 mg of protein per 100 g of wet cell mass. All produced proteins were soluble and purified by a strategy of step-wise protein precipitation (Figure 3).

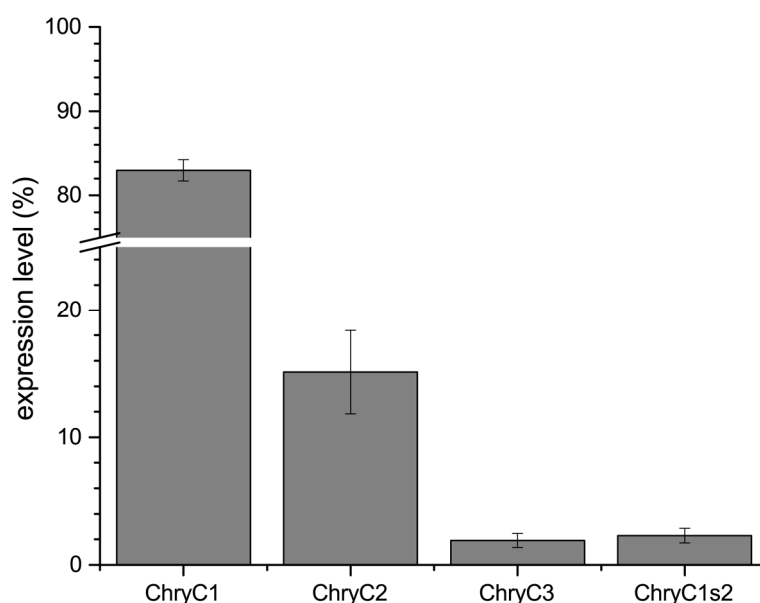


Figure 2. Normalized expression levels of egg stalk genes including the transcript variant ChryC1s2. Error bars indicate standard deviation. The mean expression ratio of ChryC1:ChryC2:ChryC3 is 43:8:1.

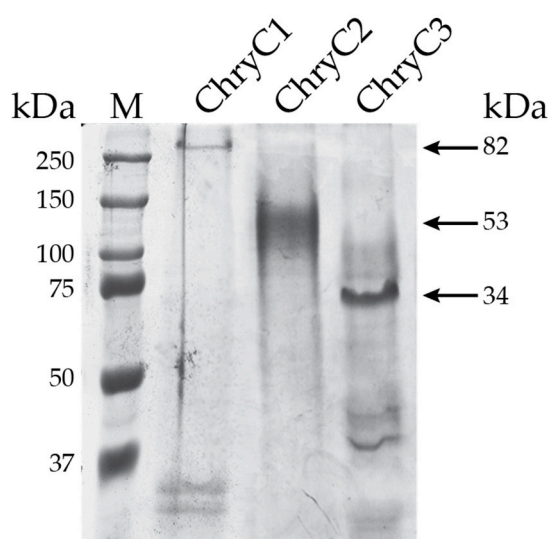


Figure 3. SDS-PAGE of purified egg stalk proteins. Due to their amino acid composition, all proteins run slower than expected for their theoretical molecular weight given next to the arrows. However, such a feature is often seen for the assay for silk proteins due to an insufficient interaction with SDS [16]. First lane shows the marker (M).

Circular dichroism (CD) analysis revealed a mainly random coil structure indicated by local minima below 200 nm, with some alpha helical content in aqueous solution (Figure 4) [17]. Interestingly, beta-sheet-rich structures could be induced in the presence of ethanol, indicated by local minima at 218 nm and local maxima below 200 nm (Figure 4).

With the protein produced and the ability to assemble confirmed, it had to be determined if any of the three identified silk proteins showed self-assembly properties, as it was hypothesized this would be necessary for egg stalk fiber formation. At concentrations above 6 mg·mL⁻¹ ChryC1 self-assembled into sheet-like film structures (Figure 5). Measurements by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and subsequent Fourier self-deconvolution (FSD) of the dried ChryC1 films revealed that these films comprised a high content of beta-sheets, nearly 50% (Table 1, Figure S6). In order to exclude this structural composition from being induced by the drying process, ChryC1 films

were incubated in D₂O and measured in the wet state as a control and the distribution of secondary structure elements were shown to be unchanged (Table 1).

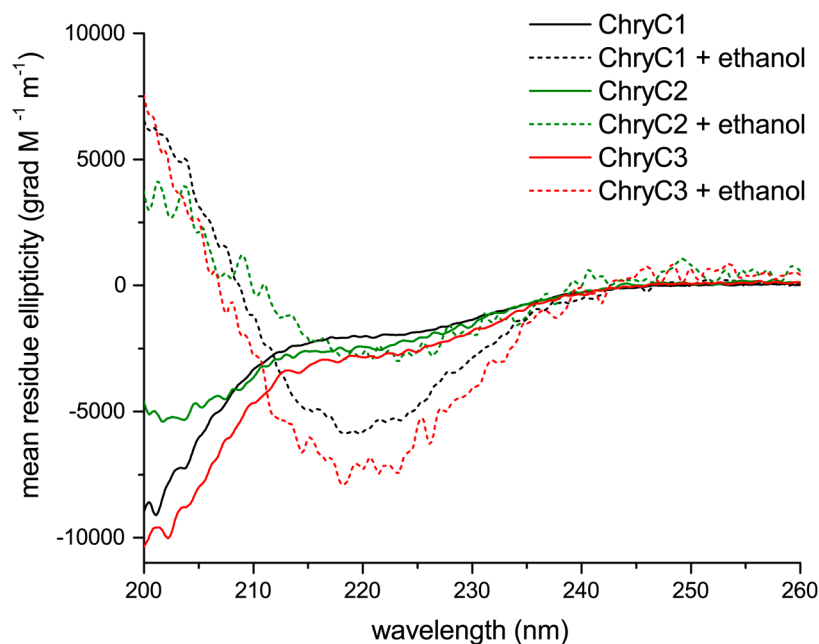


Figure 4. Circular dichroism spectra of ChryC1, ChryC2, and ChryC3 in 10 mM NH₄HCO₃, in the absence or presence of four volumes of 100% ethanol (pro analysis; p.a.), respectively.

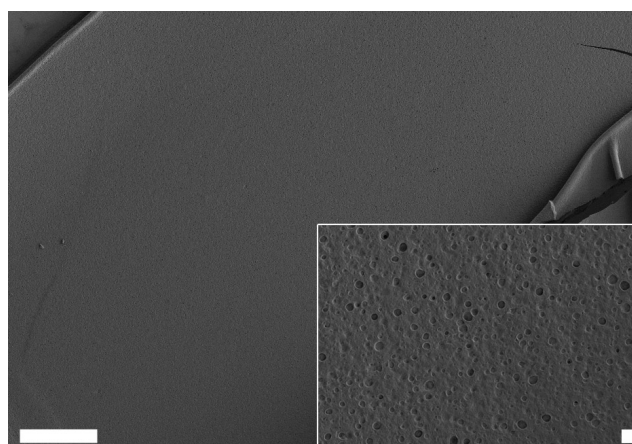


Figure 5. Scanning electron microscopy (SEM) images of self-assembled ChryC1 films. Scale bars: 100 μ m and 2 μ m (inset), respectively.

Table 1. Content of secondary structures in ChryC1 films as evaluated by Fourier self-deconvolution. The data represent mean values obtained from two protein films \pm standard deviation. All values are rounded to whole numbers.

Secondary Structure	Dry Film	Wet Film
	Fraction (%)	Fraction (%)
Side chains	5 \pm 1	11 \pm 1
β -sheets	48 \pm 2	47 \pm 1
α -helices	7 \pm 0	5 \pm 0
Random coils	24 \pm 1	22 \pm 0
Turns	17 \pm 1	15 \pm 1

ChryC2, in contrast, self-assembled into hydrogels above concentrations of 1 mg·mL⁻¹. Analysis using transmission electron microscopy (TEM) revealed the presence of nanofibrils in this hydrogel

(Figure 6b) which comprise significant beta sheet structure content, as confirmed by CD analysis (Figure S5).

ChryC3 did not show any self-assembly properties under the tested conditions.

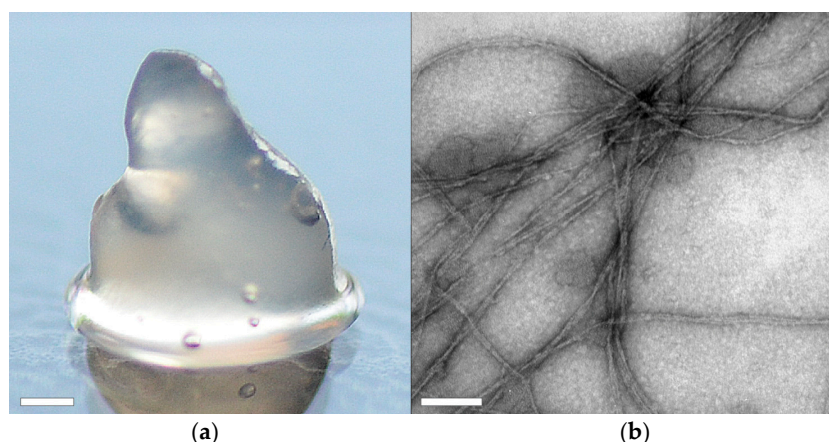


Figure 6. Morphology of a self-assembled ChryC2 hydrogel. (a) Photograph of a ChryC2 hydrogel. Scale bar: 1 mm; (b) Transmission electron microscopy imaging revealed the morphology of the underlying fibrils was 5 nm in diameter. Scale bar: 100 nm.

Since self-assembly of proteins into films in fully-aqueous solution is non-typical for proteins, soluble ChryC1 was analyzed in more detail to gain insights into the mechanism of its self-assembly, which revealed a lower critical solution temperature (LCST) behavior resulting in turbid ChryC1 solutions above a distinct temperature. Differential scanning calorimetry (DSC) measurements determined a transition point at 27.3 °C (Figure 7). The LCST behavior could be confirmed upon cooling down the sample, since the agglomeration was completely reversible, as confirmed by ultracentrifugation and subsequent protein concentration determination (data not shown). Since ChryC2 was prone to gelation, this protein was not suitable for DSC measurements. However, heating of low-concentration ChryC2 solutions (<1 mg·mL⁻¹) up to 50 °C did not result in any visible turbidity as observed for ChryC1 solutions in the same concentration regime (data not shown). ChryC3 did not exhibit any LCST behavior (Figure 7), which independently confirmed that this protein variant is not able to self-assemble.

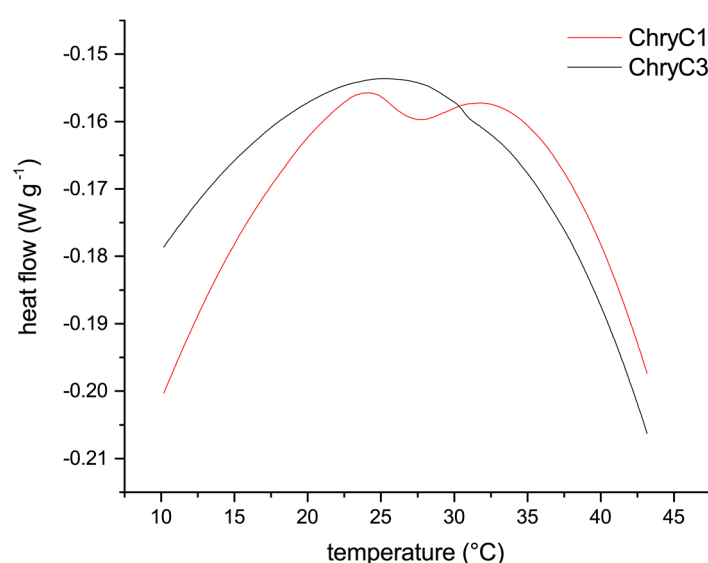


Figure 7. Differential scanning calorimetry measurements of ChryC1 and ChryC3 solutions. For ChryC1, the local minimum of the heat flow at 27.3 °C indicates the transition point for the LCST behavior.

Further analysis of the changes in protein structure upon the addition of ethanol revealed that assembly of ChryC1 into microscopic fibers could then occur below the LCST. Subsequent scanning electron microscopy (SEM) analysis revealed fiber diameters of 13 μm and smooth surfaces (Figure 8).

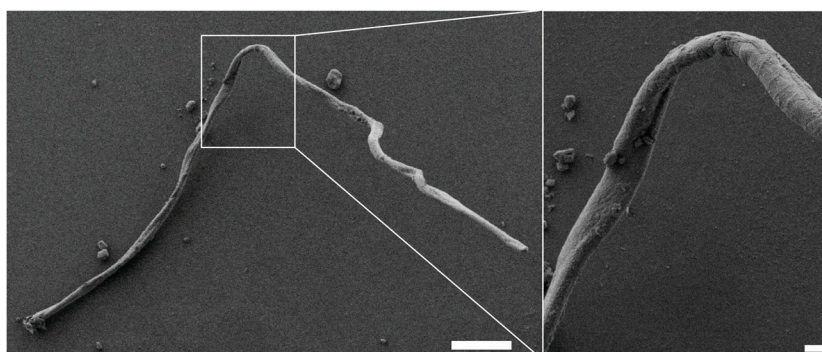


Figure 8. SEM image of a ChryC1 fiber, assembled after addition of four volumes of 100% ethanol (p.a.) to an aqueous solution of ChryC1. The image on the right depicts a magnification of the white frame on the left; scale bars: 100 μm (left) and 10 μm (right), respectively.

3. Discussion

In 2009, 50 years after X-ray diffraction studies were first used to identify cross-beta structures in egg stalk fibers from lacewings, the first protein sequence of lacewing silk was identified [6]. In this study, further sequences were identified from the European *C. carnea* and named ChryC1 and ChryC2. These proteins were shown to exhibit a high sequence identity, comparable to the published MalXB1 and MalXB2 of the Australian *M. signata*. The homologous sequences of the two Australian versus European lacewing silks mainly differed regarding the length of individual domains rather than the overall structure of the consecutive domains. For instance, ChryC2 comprises a much shorter N-terminal domain than MalXB2 (63 vs. 152 amino acid residues), yet the repetitive core domains of both proteins exhibit a 16-residue periodicity with a pronounced positive net charge. Interestingly, a further egg stalk silk protein (ChryC3) could be identified, and was shown to be unique compared to the other silk protein variants. Remarkably, all identified sequences, including transcript variants, further shared a motif consisting of cysteine and aspartate residues (in certain variations) at the carboxyl-terminus of their C-terminal domain. The functional role of this motif remains unclear, however, it has already been suggested that cystine cross-links might contribute to the rigidity in egg stalk fibers [6].

Recombinant expression of non-codon-optimized genes (i.e., cDNA comprising the natural sequence) was possible in *E. coli*, which is generally considered to be challenging especially for large and/or highly repetitive sequences [18]. The individual silk proteins considerably differed in their properties, especially in terms of self-assembly. In a concentration-dependent manner, ChryC1 self-assembled into water-insoluble film structures with high beta sheet content and exhibited LCST behavior, whereas ChryC2 formed hydrogels. In contrast, ChryC3 did not show any self-assembly properties, and it is likely that this is a subordinate silk protein; however the exact function cannot be speculated from these results.

All protein variants in aqueous solution could be converted from random coil to beta sheet conformation by adding ethanol to the solvent, which is in good agreement with observations from other silk systems [19]. However, the ethanol-induced self-assembly of ChryC1 fibers in the mm-length regime was unexpected and seems to be unique amongst silk proteins. This supports the hypothesis that the silk fiber processing of lacewing silks most likely depends on triggered self-assembly, and not on shear stress, as in organisms which use a spinning apparatus (spiders, silk worms).

In general, it is assumed that a pre-ordered state of proteins in solution is a necessary condition for natural fiber processing [2]. Interestingly, all three identified proteins of *C. carnea* egg stalks

showed an intrinsically disordered structure in solution, but a completely different assembly behavior. The study of recombinant silk proteins is the basis for the determination of the mechanism behind controlled formation of natural egg stalks.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

Chemicals were obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany) if not stated otherwise. Double-distilled water was prepared using a Millipore system from Merck (Darmstadt, Germany). For dialyses, membranes were used with a molecular weight cut-off of 6–8 kDa (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA). DNA purification and ligation with the pGEM-T vector system was performed according to the manufacturer's protocol (Promega, Madison, WI, USA). For PCR, Taq polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) was used if not stated otherwise. Synthetic oligonucleotides for PCR and qPCR were obtained from Microsynth (Balgach, Switzerland) and Eurofins (Ebersberg, Germany), respectively (Table S1). The used cloning strain was *Escherichia coli* DH10B (Novagen, Madison, WI, USA). Green lacewings of species *Chrysoperla carnea* were obtained from Sautter and Stepper (Ammerbuch, Germany).

4.2. *Chrysoperla carnea* Silk Gland Partial Transcriptome Sequencing

Colleterial glands of six female lacewings were dissected, immediately transferred into liquid nitrogen and disrupted with mortar and pestle. ChryC1 and ChryC2, RNA isolation and cDNA synthesis was performed using the SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) and the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), respectively, according to the manufacturer's protocol. For cDNA synthesis, 10 pmol of a modified oligo-d(T)₁₈ primer were used. After the reaction was terminated, RNA was hydrolyzed by adding 3 µmol NaOH and incubation at 95 °C for 5 min, followed by neutralization with HCl. Subsequent amplification was conducted by PCR under the following conditions (used primers: see Table S1: PCR for TA-cloning): 95 °C for 2 min, 30 cycles at 95 °C for 30 s, 36.3 °C for 30 s, 68 °C for 3 min, and final extension at 68 °C for 5 min using a MyCycler from BioRad (Hercules, CA, USA). Additionally, formamide was added after 17 cycles at 0.5% (v/v) final concentration. After DNA purification, PCR products were ligated with pGEM-T vector and transformed into *E. coli* according to the manufacturer's protocol. After colony PCR screening, plasmids with inserts were sequenced.

RNA of ChryC3 was obtained by dissecting colleterial glands of 90 female lacewings, as described above. RNA isolation was performed using the Oligotex system (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. cDNA was synthesized by the template switch method, as described previously [12]. Briefly, 290 ng of poly-A⁺ mRNA were mixed with 20 pmol of sequence-specific primer ChryC3_cDNA, 20 pmol of template-switch primer and 10 nmol of deoxynucleotides (dNTPs) (Table S1). After heating at 65 °C for 5 min, all components of the Maxima H Minus Reverse Transcription system (Thermo Scientific) were added according to the manufacturer's protocol, and the reaction was performed at 50 °C for 30 min and then terminated at 85 °C for 5 min. RNA was then hydrolyzed by adding 50 nmol NaOH and incubation at 68 °C for 30 min, followed by neutralization with HCl. Subsequently, 15 µL of cDNA were used for amplification by DreamTaq (Thermo Scientific) at Touchdown PCR conditions (used primers: "Anchor forw" and "ChryC3 rev", see Table S1): 95 °C for 1 min, 5 cycles of 95 °C for 30 s, 56 °C (1 °C decreased at each cycle) for 30 s, 72 °C for 3 min, 30 cycles at 95 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, 72 °C for 3 min. After preparative agarose gel electrophoresis, the 1.3 kb DNA band was excised from the gel, purified, ligated with pGEM-T vector, and transformed into *E. coli* as described above. After colony PCR screening, plasmids with inserts were sequenced. The signal peptide was predicted using SignalP 4.1 [20].

The elongation factor 1 α (EF-1 α) represents a well-established reference gene for qPCR [21]. Initially, in order to be able to design optimal qPCR primers for EF-1 α , this gene of *C. carnea* was partially sequenced. Therefore, genomic DNA was isolated during RNA preparation for qPCR: after

the lysate of colleterial glands passed the DNA column of the innuPREP RNA Mini Kit (see 4.3), the column was treated with the DNA purification system starting with a washing step. A 1.9 kb fragment of EF-1 α was amplified by PCR with primers designed based on the respective sequence of the related species *Chrysopa perla* (Genbank accession no.: JQ519512.1) [22]. In order to determine the position of the intron segment, PCR was further conducted with cDNA as template. After preparative agarose gel electrophoresis, both products were treated as described above (Genbank accession no. of mRNA fragment: KY906181; Genbank accession no. of genomic DNA fragment: KY906182).

4.3. Quantitative PCR

Colleterial glands of six female lacewings and abdomen of five male lacewings were dissected and immediately transferred into liquid nitrogen. The frozen tissue was disrupted in Eppendorf tubes filled with liquid nitrogen using polypropylene pellet pestles from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). RNA isolation was performed using the innuPREP RNA Mini Kit from Analytik Jena (Jena, Germany) according to the manufacturer's protocol. cDNA synthesis was performed as described above for ChryC1 and ChryC2, yet 100 pmol of random hexamers were used for each sample instead of the modified oligo-d(T)₁₈ primer, and subsequent RNA hydrolysis was omitted. Aliquots of all cDNA samples were stored at -80°C until being used for qPCR.

qPCR was conducted using the innuMIX qPCR MasterMix and the qTOWER 2.0 (Analytik Jena,) according to the manufacturer's protocol. Every cDNA sample was tenfold diluted prior to analysis, and 4 pmol of each primer were used at a reaction volume of 20 μL . The qPCR program comprised a melting step at 95°C for 2 min, 30 cycles at 95°C for 5 s, 65°C for 20 s, and a melting ramp from 60 to 95°C . The heating rate was $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$. Every sample was analyzed as triplicate; the no-template controls (NTC) were analyzed as duplicate. Additionally to the determination of the melting temperatures of the resulting qPCR products (Table S2), the specificity of amplification was confirmed by 1.5% (*w/v*) agarose gel electrophoresis (Figure S4). Based on the raw data, the actual PCR efficiencies and C_q -values were calculated using the software LinRegPCR [13].

4.4. Cloning and Expression of Silk Sequences

All signal-peptide-free (but otherwise full-length native) encoding sequences of ChryC1–3 were cloned into pET28a(+) from Novagen (Madison, WI, USA) by restriction-free cloning [15]. The chosen vector provided an N-terminal His6-tag to each encoding sequence. All proteins were recombinantly produced in *Escherichia coli* BL21-Gold (DE3) pLysS (Novagen) cultured at 30°C in a 5 L BIOSTAT B plus fermenter (Sartorius, Goettingen, Germany) using lysogeny broth (LB) Lennox medium additionally containing 24 mM $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 35 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kanamycin and 0.001% (*v/v*) Breox FMT 30 antifoam (Cognis, Monheim, Germany). Expression was induced by adding 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) at an optical density (600 nm) between 3.0 and 3.5. Cells were harvested after expression for 4 h at 30°C and suspended in buffer (50 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 8). Recombinant protein production was confirmed by comparing protein composition in *E. coli* cells before and after gene expression induction by SDS-PAGE (data not shown).

4.5. Protein Purification

ChryC1 and ChryC3 were purified as previously described for the recombinant protein N[AS]₈C with slight modifications [23]. Briefly, harvested cells were resuspended in 50 mM TRIS/HCl, 100 mM NaCl, pH 8.0 and after cell disruption, the lysate was treated at 80°C for 20 min. After centrifugation (20,000 \times g for 20 min), the supernatant was acidified with acetic acid to pH 4.2 and incubated for 2 h. After centrifugation, the supernatant was neutralized with NaOH to pH 8.0 and fractionally precipitated using $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.8 M and 1.5 M). The pellet was washed with 1.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 mM sodium phosphate, pH 8.0 including sonication using a Sonopuls HD3200/KE76 ultrasonicator (Bandelin, Berlin, Germany) until no more DNA was detectable in the washing buffer (monitored using a NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)). The final pellet was solubilized in 6 M guanidinium

thiocyanate (GdmSCN) and dialyzed against 10 mM NH_4HCO_3 . Following centrifugation, the supernatant was lyophilized.

Since ChryC2 did not sufficiently precipitate in the presence of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, the purification protocol was slightly modified: after heat treatment and acidification, the neutralized supernatant was precipitated in the presence of 0.3% (*w/v*) polyethylenimine (PEI; 25,000 g·mol^{−1}) (Sigma-Aldrich,) and centrifuged. After addition of 0.5% (*w/v*) sodium dodecylsulfate (SDS) and centrifugation, ChryC2 was precipitated by adding 0.8 volumes of acetone (p.a.) to the supernatant and incubating for 1 h at −20 °C. The resulting pellet was washed with ice-cold DNA washing buffer as described above. ChryC2 was selectively solubilized by adding 4 M urea, 20 mM TRIS/HCl, pH 8.0, and incubated for 16 h at room temperature under constant shaking. After centrifugation and subsequent dialysis of the supernatant against 10 mM NH_4HCO_3 the resulting solution was lyophilized.

The extinction coefficient of ChryC2 (18,450 M^{−1}·cm^{−1}) was calculated using ProtParam [24]; the extinction coefficients of ChryC1 (18,460 M^{−1}·cm^{−1}) and ChryC3 (11,390 M^{−1} cm^{−1}) were determined by gravimetric analysis, since their predicted values were << 10,000 M^{−1} cm^{−1} and not reliable. Since the proteins were not accessible to matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-TOF), their purity was confirmed by SDS-PAGE as previously described [25]. Additionally, dot blot analysis of the purified proteins confirmed the presence of the His-tag (data not shown).

4.6. Secondary Structure Analysis (CD and FTIR)

Far-UV CD spectra were recorded using a J-815 CD spectrometer (Jasco, Gross-Umstadt, Germany) at 20 °C with a scanning interval of 0.1 nm, a digital integration time of 1 s, a bandwidth of 1 nm, a scanning speed of 50 nm·min^{−1}, and three accumulations. All measurements were conducted using 4.1–7 µM protein solutions in 10 mM sodium phosphate, pH 7.5 in quartz cuvettes with 1 mm path length; four volumes of 100% ethanol (p.a.) were added to each protein solution to test its impact, and spectra were recorded after incubation for 16 h at room temperature.

FTIR spectra of ChryC1 films were taken using a Tensor 27 spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA). Spectra were measured by attenuated total reflection (ATR) with a resolution of 4 cm^{−1} and averaging of 120 scans. Individual secondary structure elements were determined by FSD of the amide I band (1590–1720 cm^{−1}). Band assignments were made according to Hu et al.[26]. The presented data reflect mean values ± standard deviation derived from two films each; each sample was tested at three spots.

4.7. Differential Scanning Calorimetry

Differential scanning calorimetry experiments were performed using the DSC 1 STARe System (Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA). Measurements were conducted using protein concentrations of 124 µM (ChryC1) and 490 µM (ChryC3), respectively, at a heating rate of 5 K·min^{−1}.

4.8. Self-Assembly of ChryC1 and ChryC2

ChryC1 (6 mg·mL^{−1}) was dissolved in 6 M GdmSCN and dialyzed against 10 mM NH_4HCO_3 . Any protein aggregates were removed by ultracentrifugation (186,000× *g* for 45 min), and the resulting supernatant was concentrated by dialysis against 20% (*w/v*) poly(ethylene glycol) (20,000 g·mol^{−1}), 10 mM NH_4HCO_3 at 4 °C. Resulting protein assemblies were washed with water and dried at room temperature. In order to exclude artefacts caused by drying, films were prepared and washed 10 times with D₂O directly after dialysis and measured in the wet state.

For fiber assembly, a ChryC1 solution (2 mg·mL^{−1}) was prepared as described above including ultracentrifugation. The resulting supernatant was mixed with 4 volumes of 100% ethanol (p.a.) by inverting the sample.

For hydrogel formation, ChryC2 (3 mg·mL^{−1}) was dissolved in 6 M GdmSCN and dialyzed against 10 mM NH_4HCO_3 . The resulting hydrogel was used for TEM analysis and, in order to increase

stability, concentrated to a tenth part of its volume by dialysis against 20% (*w/v*) poly(ethylene glycol) (20,000 g·mol⁻¹), 10 mM NH₄HCO₃ at 4 °C prior photographic documentation.

4.9. Electron Microscopy

Samples for SEM were sputter-coated with 1.3 nm of platinum using a 208HR sputter coater (Cressington, Watford, UK) and subsequently analyzed using a 1540 EsB Crossbeam (Zeiss, Oberkochen, Germany) at 2 kV.

Assembled ChryC2 fibrils were diluted to 0.5 mg·mL⁻¹, and 5 µL of the dilution were applied on supports (Pioloform-carbon-coated 100-mesh copper grids (Plano GmbH, Wetzlar, Germany)), incubated for 5 min, washed with 5 µL of double-distilled H₂O, and fibrils were negatively stained for 2 min using 5 µL of 2% uranyl acetate solution. After washing with 5 µL of water, the sample was allowed to dry for 24 h at room temperature before imaging. TEM imaging was performed using a JEM-2100 (JEOL, Tokyo, Japan) operated at 80 kV. Images were recorded using an UltraScan 4000 camera (Gatan, Pleasanton, CA, USA) and Gatan Digital Micrograph software (version 1.83.842).

Supplementary Materials: The following items are available online at www.mdpi.com, Table S1: Overview of synthetic oligonucleotides used in this study, Table S2: Melting temperatures (*T_m*) of qPCR products amplified in this study, including standard deviation (s.d.), Figure S1: Protein sequence of ChryC1, Figure S2: Protein sequence of ChryC2, Figure S3: Protein sequences of all found transcript variants of ChryC1, Figure S4: 1.5% (*w/v*) agarose gel of qPCR products, Figure S5: CD spectrum of self-assembled ChryC2 fibrils, Figure S6: Fourier self-deconvolution (FSD) of FTIR spectra of self-assembled ChryC1 films, Figure S7: Phylogenetic tree of lacewings according to NCBI taxonomy.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge financial support of the Bavarian State Ministry of the Environment and Consumer Protection, FKZ: U8793-2012/6-2 and from EFRE Ziel ETZ Freistaat Bayern—Tschechien project no. 123. We thank Claudia Stemmann for the help at SEM, Tamara Aigner for the help at TEM, and Elise DeSimone for proofreading the manuscript.

Author Contributions: M.N. and T.S. conceived and designed the experiments; M.N. performed the experiments; and M.N. and T.S. wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ruzicka, Z. Protective role of the egg stalk in *Chrysopidae* (Neuroptera). *Eur. J. Entomol.* **1997**, *94*, 111–114.
2. Jin, H.J.; Kaplan, D.L. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature* **2003**, *424*, 1057–1061.
3. Shao, Z.; Vollrath, F. Surprising strength of silkworm silk. *Nature* **2002**, *418*, 741.
4. Parker, K.D.; Rudall, K.M. Structure of the silk of chrysopa egg-stalks. *Nature* **1957**, *179*, 905–906.
5. Bauer, F.; Bertinetti, L.; Masic, A.; Scheibel, T. Dependence of mechanical properties of lacewing egg stalks on relative humidity. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3730–3735.
6. Weisman, S.; Okada, S.; Mudie, S.T.; Huson, M.G.; Trueman, H.E.; Sriskantha, A.; Haritos, V.S.; Sutherland, T.D. Fifty years later: The sequence, structure and function of lacewing cross-beta silk. *J. Struct. Biol.* **2009**, *168*, 467–475.
7. Scheibel, T. Spider silks: Recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microb. Cell Fact.* **2004**, *3*, 14.
8. Omenetto, F.G.; Kaplan, D.L. New opportunities for an ancient material. *Science* **2010**, *329*, 528–531.
9. Schacht, K.; Scheibel, T. Controlled hydrogel formation of a recombinant spider silk protein. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2488–2495.
10. Lucas, F.; Shaw, J.T.B.; Smith, S.G. Amino-acid composition of the silk of chrysopa egg-stalks. *Nature* **1957**, *179*, 906–907.
11. Sutherland, T.D.; Young, J.H.; Weisman, S.; Hayashi, C.Y.; Merritt, D.J. Insect silk: One name, many materials. *Annu. Rev. Entomol.* **2010**, *55*, 171–188.
12. Zhu, Y.Y.; Machleder, E.M.; Chenchik, A.; Li, R.; Siebert, P.D. Reverse transcriptase template switching: A SMART™ approach for full-length cDNA library construction. *Biotechniques* **2001**, *30*, 892–897.
13. Ramakers, C.; Ruijter, J.M.; Deprez, R.H.; Moorman, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* **2003**, *339*, 62–66.

14. Bustin, S.A.; Benes, V.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W. Quantitative real-time RT-PCR—A perspective. *J. Mol. Endocrinol.* **2005**, *34*, 597–601.
15. Unger, T.; Jacobovitch, Y.; Dantes, A.; Bernheim, R.; Peleg, Y. Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *J. Struct. Biol.* **2010**, *172*, 34–44.
16. Huemmerich, D.; Helsen, C.W.; Quedzuweit, S.; Oschmann, J.; Rudolph, R.; Scheibel, T. Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry* **2004**, *43*, 13604–13612.
17. Kelly, S.M.; Jess, T.J.; Price, N.C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1751*, 119–139.
18. Vendrely, C.; Scheibel, T. Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications. *Macromol. Biosci.* **2007**, *7*, 401–409.
19. Spiess, K.; Wohlrab, S.; Scheibel, T. Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films. *Soft Matter* **2010**, *6*, 4168–4174.
20. Petersen, T.N.; Brunak, S.; von Heijne, G.; Nielsen, H. SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* **2011**, *8*, 785–786.
21. Ponton, F.; Chapuis, M.P.; Pernice, M.; Sword, G.A.; Simpson, S.J. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **2011**, *57*, 840–850.
22. Klopstein, S.; Ronquist, F. Convergent intron gains in hymenopteran elongation factor-1 α . *Mol. Phylogenet. Evol.* **2013**, *67*, 266–276.
23. Bauer, F.; Scheibel, T. Artificial egg stalks made of a recombinantly produced lacewing silk protein. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 6521–6524.
24. Wilkins, M.R.; Gasteiger, E.; Bairoch, A.; Sanchez, J.C.; Williams, K.L.; Appel, R.D.; Hochstrasser, D.F. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol. Biol.* **1999**, *112*, 531–552.
25. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
26. Hu, X.; Kaplan, D.; Cebe, P. Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. *Macromolecules* **2006**, *39*, 6161–6170.



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Information:

Table S1. Overview of synthetic oligonucleotides used in this study.

cDNA synthesis		
Mod. oligo-d(T) ₁₈		TGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
ChryC3_cDNA		TTATCAATAGCAGTTTCAGTGAAAAATTTAACAAGAGCAGTCATCAGAATCATCAGAATC
Template-switch		AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTCTCGAG(GGG)
PCR for TA-cloning into pGEM-T vector		
ChryC1 forw		GGGTGCAATGTGATC
ChryC2 forw		AATTATAATATTTGGAGTAATG
Poly-Ala-stretch		GCAGCAGCAGCGGC
As reverse-primer, modified oligo-d(T) ₁₈ was used for both ChryC1 (including all transcript variants), ChryC2, and the first identified fragment of ChryC3.		
Anchor forw (for ChryC3)		AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG
ChryC3 rev		GTACCAGTACTCGAGTGCATTTTCAG
Restriction-free cloning of ChryC1-3 into expression vector		
ChryC1_forw		GGACAGCAATGGGGTCGCGGATCCATGGGTGGTTGCAATGTGATCGCCTACCCAAC
ChryC1_rev		GGTGCTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTCATTAACAAGAACAATCATCAGAATCATCAG
ChryC2_forw		GGACAGCAATGGGGTCGCGGATCCATGGGTAAATTATAATATTTGGAGTAATGTGAACG
ChryC2_rev		GTGGTGCTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTCATTAACATTCATAATCGTAATAATCGTC
ChryC3_forw		GGACAGCAATGGGGTCGCGGATCCATGGGTTTTGTGGTTCGCTTACCATG
ChryC3_rev		GCTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTCATTAACAAGAGCAGTCATCAGAATCATC
Sequencing of elongation factor 1 alpha (EF-1α)		
EF-1a_gen_f		GGGTGTCAAACAATTGATTGTCTG
EF-1a_gen_r		ACCAGCTACGTATCCTCTTCG
Colony PCR		
universe(pUC)		AGGGTTTCCCAGTCACGACGTT
reverse(pUC)		GAGCGGATAACAATTCACACAGG
qPCR		
qPCR-EF-f		GTCTTCCTCTCCAGGATGTCTAC
qPCR-EF-r		AGCGAATACTACAACCATACTGG
qPCR-C1-f		GGATCAGGTTTCAGCAAGTTCAGG
qPCR-C1-r		AAGCTGCTCCAGATGCTGCAG
qPCR-C1s2-f		ATCAACTGCGACTGCAAGTAAAGAC
qPCR-C1s2-r		ATGCTCCCGATGCAGCTGAG

qPCR-C2-f	TGGATCATCAGCTTCCGGTTCG
qPCR-C2-r	TCCCGAACCGGATGAGGAGC
qPCR-C3-f	TCCACCTAATTGTGGTTCATCAGG
qPCR-C3-r	ACGCTGCGCCTGAACCAGAG

All sequences are indicated according to 5'-3' nomenclature. RNA-nucleotides are given in parentheses. "qPCR-C1-f" and "qPCR-C1-r" were designed to bind at a conserved region encoding the N-terminal domain of ChryC1, being able to amplify both the full-length construct of ChryC1 and all known transcript variants of ChryC1. In order to prevent both unspecific binding of qPCR primers to competing silk-encoding proteins and formation of primer-dimers, all qPCR primers were analyzed using bioinformatics tools (NCBI primer-BLAST and OligoAnalyzer 3.1). First partial sequencing of ChryC3 was achieved by PCR using "Poly-Ala-stretch" as forward and "Mod. oligo-d(T)₁₈" as reverse primers, respectively.

Table S2. Melting temperatures (T_m) of qPCR products amplified in this study, including standard deviation (s.d.).

sample	average T_m [°C]	s.d.
cDNA female EF-1a	79.0	0.1
cDNA male EF-1a	79.1	0.06
cDNA female ChryC1	85.5	0.17
cDNA female	83.3	0.17
cDNA female ChryC2	85.6	0.06
cDNA female ChryC3	86.8	0.06

GCNVIAYPTASC GDSGSGSGSASSGAASGAASGSGAASGSGAASGSGSAAAASGAASGSGSAAGSGAASGSGSAAGSG
 AASGSGSAAGSGAASGSGSAAGSGAASGSGSGSSSSGSSSSGSSGGCGGGSGSASSG
 GSSASATKNSAGASSN
 GSSAGASNGSAGASSG
 GSSASATKNSAGASSG
 SSSAGASNGSAGASSC
 GSSATATKNSAGASSG
 GSTAGASNGSAGASSG
 GSSSSATKNSAGASSN
 GSSAGASNGSAGASSG
 GSSSSATQNSAGASSN
 GSSAGASNGSAGASSG
 GSSSSATQNSAGASSN
 GSSAGASNGTAGASSG
 GSSSSATKESAGASSN
 GSTATASKDSAGASSG
 GSSVGATASGAGAASGGSVSSATKNSSAASSQGSSVSIISNGVVSAASNGATTSAAGSASSASGGSSANVGG
 GSASGSSN
 GATSSANGSSASGSSG
 GSSSSAGAGSASGSSG
 NSSSSASGNTASGSSG
 DSSSSAGSGTASGSSG
 GATSTAGSGSASGSSG
 SSSSSAGSGSASGSSG
 NSSSSASGGTASGSSN
 GATSSAGSGTASGSSG
 GSSSSAGSGTASGSSG
 DSSSSAGSGSASGSSG
 GATSSAGSGSASGSSG
 NSSSSAGSGSASGSSG
 DSSSSAGSGSASGSSG
 GATSTAGSGSASGSSG
 NSSSSAGSGSASGSSG
 DSSSSAGSGSASGSSG
 GASSSAGSGSASGSSC
 GSTSGASSGSASGSSG
 GSSSSAGSGSASGASG
 GSSSAAGSGSASGSSG
 GSTSGASC GSASGSSG
 DSSSSAGSGSASGSSG
 GASSSAGSGSASGSSG
 GSTSGASSGSASGSSG
 GSSSSAGSGSASGASAGSSSAAGSGSASGSSGGSSSGASSGSSDGC GSGGSSGAASGAASGSGSASGSGAASGSGAA
 SGSGAASGSGAASGSGAASGSGAASGSGAASGSGSASGLGSAASSGAASSSGSAAGSGSASGSGSAASSGAASSSGS
 AAGSGSASVSGSSDDSDDCSC

Figure S1. Protein sequence of ChryC1. Genbank Accession No.: KY906176.

NYNIWSNVNAHPTNCDNSGGSSGSSASGSGAASGSGSASGSGAASGSSSSGSGSSSSGSGCGSGS
 GSASGSSG
 GSSASASKGSAGASSN
 GSVAGASKGSAGASSG
 GSSASASKGSAGASSG
 SSTAVASKGSAGASSK
 GSSASATKGSAGASSC
 GSTAGASKGAAGASSN
 GSSASASKGSAGASSG
 GSTAGASKGSAGASSN
 GSSATATKGSAGASSG
 NSTAVASKGSAGASSN
 GSSASASKGSAGASSQ
 GSSASATKGSAGATSN
 GSSAVASKGSAGAASG
 NSTASATKGSSSASSN
 GSSAGATKDGAGAASN
 GSTAVASKGSAGAASG
 NSTATASKGSAGASSN
 GSSATATKGSAGATSN
 GSSAVASKGSAGASSG
 NSTASASKGSAGASSN
 GSSASASKGSAGATSA
 GSSAVASKGSAGASSG
 NSTASASKGSAGASSN
 GSSATASKGSAGASSG
 SSSASASKGSAGATSA
 GSSAVASKGSAGASSG
 NSTASASKGSAGASSN
 GSSASASKGSAGATSA
 GSSAAASKGSASASSD
 GSSAACDSGESDAVDKANLAAIANIAAAAGKPSGKSAPS CDDYYDYE C

Figure S2. Protein sequence of ChryC2. Genbank Accession No.: KY906177.

GCNVIAYPTASC GDSGSGSGSASSGAASGAASGSGAASGSGAASGSGSAAASGAASGSGSAAGSGAASGSGSAAGSG
 AASGSGSAAGSGAASGSGSAAGSGAASGSGSGSSSSGSSSSGSSGGCGGGSGSASSG
 GSSASATKNSAGASSN
 GSSAGASNGSAGASSG
 GSSASATKNSAGASSG
 SSSAGASNGSAGASSC
 GSSATATKNSAGASSG
 GSTAGASNGSAGASSG
 GSSSSATKNSAGASSN
 GSSAGASNGSAGASSG
 GSSSSATQNSAGASSN
 GSSAGASNGSAGASSG
 GSSSSATQNSAGASSN
 GSSAGASNGTAGASSD
 DSDDCSC

Figure S3 (a). Protein sequence of a transcript variant of ChryC1, ChryC1s1. Genbank Accession No.: KY906179.

GCNVIAYPTASC GDSGSGSGSASSGAASGAASGSGAASGSGAASGSGSAAASGAASGSGSAAGSGAASGSGSAAGSG
 AASGSGSAAGSGAASGSGSAAGSGAASGSGSGSSSSGSSSSGSSGGCGGGSGSASSG
 GSSASATKNSAGASSN
 GSSAGASNGSAGASSG
 GSSASATKNSAGASSG
 SSSAGASNGSAGASSC
 GSSATATKNSAGASSG
 GSTAGASNGSAGASSG
 GSSSSATKNSAGASSN
 GSSAGASNGSAGASSG
 GSSSSATQNSAGASSN
 GSSAGASNGSAGASSG
 GSSSSATQNSAGASSN
 GSSAGASNGTAGASSG
 GSSSSATKESAGASSN
 GSTATASKDSAGASSG
 GSSVGATASGAGAASGGSVSSATKNSSAASGASAGSSSAAGSGSASGSSGGSSSGASSGSSDGC GSGGSSGAASGAA
 SGSGSASGSGAASGSGAASGSGAASGSGAASGSGAASGSGAASGSGSASGLGSAASSGAASSSGSAAGSGS
 ASGSGSAASSGAASSSGSAAGSGSASVSGSSDDSDDCSC

Figure S3 (b). Protein sequence of a transcript variant of ChryC1, ChryC1s2. Genbank Accession No.: KY906180. The sequence shown in ochre represents the beginning of the short non-repetitive region which interrupts the two repetitive domains in the full-length construct of ChryC1.

G C N V I A Y P T A S C G D S G S G S G S A S S G A A S G A A S G S G A A S G S G S A A A S G A A S G S G S A A G S G A A S G S G S A A G S G
 A A S G S G S A A G S G A A S G S G S A A G S G A A S G S G S G S S S G S S S S G S S G G C G G G S G S A S S G
 G S S A S A T K N S A G A S S N
 G S S A G A S N G S A G A S S G
 G S S A S A T K N S A G A S S G
 S S S A G A S N G S A G A S S C
 G S S A T A T K N S A G A S S G
 G S T A G A S N G S A G A S S G
 G S S S S A T K N S A G A S S N
 G S S A G A S N G S A G A S S G
 G S S S S A T Q N S A G A S S N
 G S S A G A S N G S A G A S S G
 G...
 ...G S A S G S S G
 G A T S T A G S G S A S G S S G
 N S S S S A G S G S A S G S S G
 D S S S S A G S G S A S G S S G
 S A S S S A G S G S A S G S S G
 G S T S G A S S G S A S G S S G
 G S S S S A G S G S A S G A S A G S S S A A G S G S A S G S S G G S S S G A S S G S S D G C G S G G S S G A A S G A A S G S G S A S G S G S A S G S G A A
 S G S G A A S G S G A A S G S G A A S G S G A A S G S G A A S G S G A A S G S G A A S G S G A A S G S G A A S G S G A A S G S G A A S G S G A A S G S G S
 A S G S G S A A S S G A A S S S G S A A G S G S A S G S G S D D D S D D C S C

Figure S3 (c). Partial protein sequence of a transcript variant of ChryC1, ChryC1s3.

G C N V I A Y P T A S C G D S G S G S G S A S S G A A S G A A S G S G A A S G S G S A A A S G A A S G S G S A A G S G A A S G S G S A A G S G
 A A S G S G S A A G S G A A S G S G S A A G S G A A S G S G S G S S S G S S S S G S S G G C G G G S G S A S S G
 G S S A S A T K N S A G A S S N
 G S S A G A S N G S A G A S S G
 G S S A S A T K S S A G A S S G
 S S S A G A S N G S A G A S S C
 G S S A T A T K N S A G A S S G
 G S T A G A S N G S A G A S S G
 G S S S S A T K N S A G A S S N
 G S S A...
 ...S G S A S G S S G
 G S A S G A S C G S A S G S S G
 D S S S S A G S G S A S G S S G
 G A S S S A G S G S A S G S S G
 G S T S G A S S G S A S G S S G
 G S S Y S A G S G S A S G A S A G S S S A A G S G S A S G S S G G S S S G A S S G S S D G C G S G G S S G A A S G A A S G S G S A S G S G S A S G S G A A
 S G S G A A S G S G A A T G S G A A S G S G A A S G S G A A S G S G A A S G S G A A S G S G S A S G S G S A A S S G A A S S S G S A A G S G S A S G S E S
 A A S S G A A S S S G S A A G S G S A S G S G S D D S D D C S C

Figure S3 (d). Partial protein sequence of a transcript variant of ChryC1, ChryC1s4.

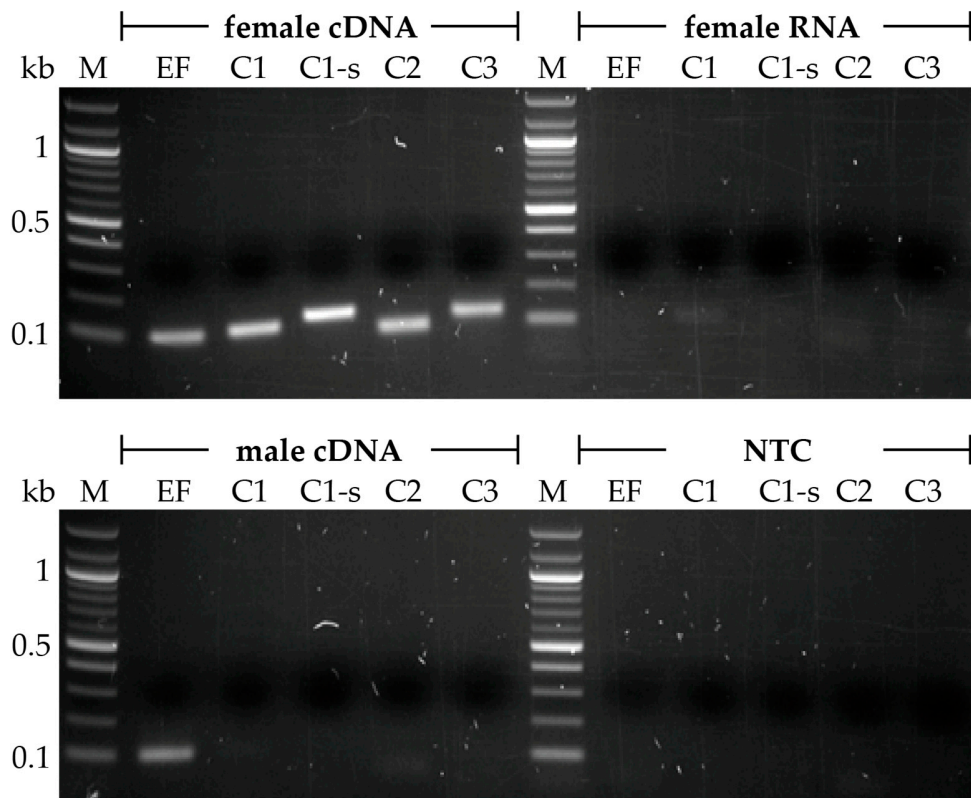


Figure S4. 1.5% (w/v) agarose gel of qPCR products. M: Marker, EF: Elongation factor 1 α , C1: ChryC1, C1-s: ChryC1s2, C2: ChryC2, C3: ChryC3, NTC: No template control. Each lane was loaded with 8 μ l of qPCR-sample.

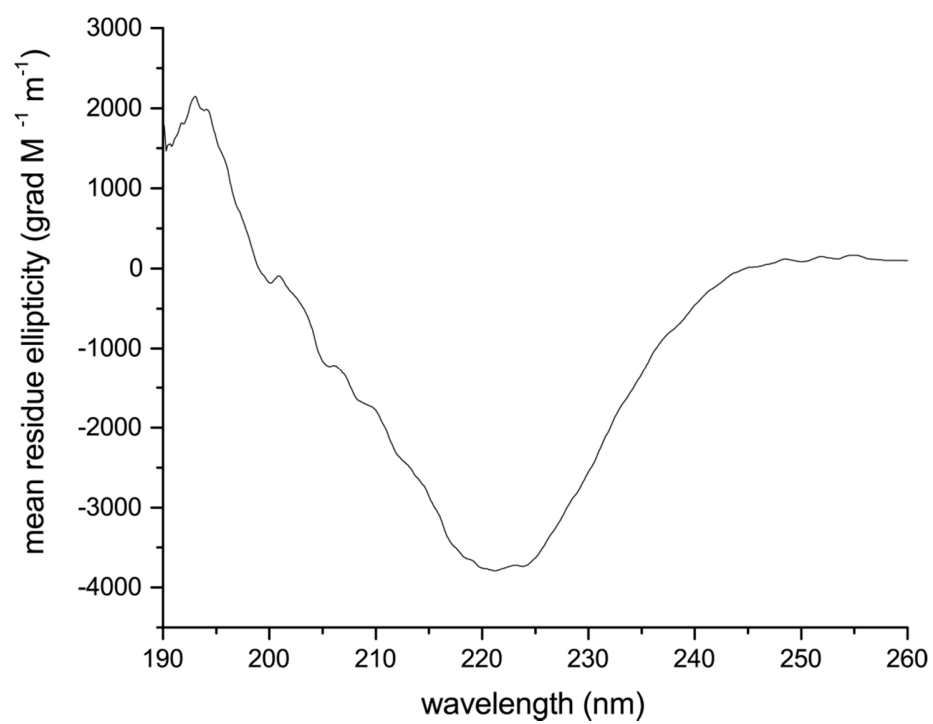


Figure S5. CD spectrum of self-assembled ChryC2 fibrils. Measured in 10 mM sodium phosphate, pH 7.5.

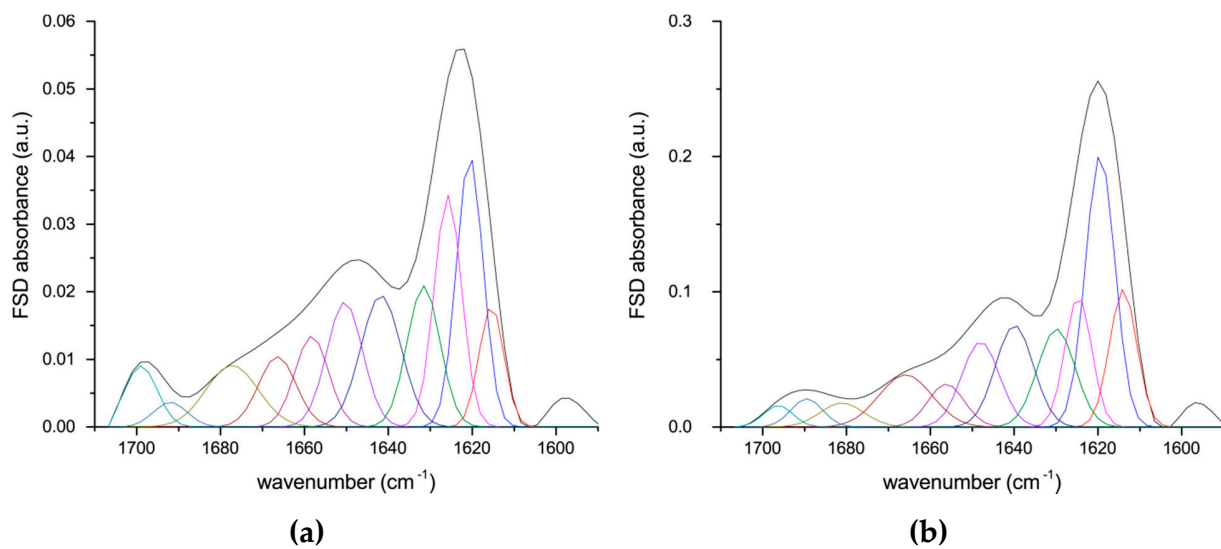


Figure S6. Fourier self-deconvolution (FSD) of an exemplary FTIR spectrum of **(a)** a dried ChryC1 film and **(b)** a wet ChryC1 film after incubation in D₂O.

Insecta
 Dicondylia
 Pterygota
 Neoptera
 Endopterygota
 Neuropterida
 Neuroptera
 Chrysopidae
 Chrysoperla
 Chrysoperla adamsi
 Chrysoperla agilis
 Chrysoperla calocedrii
 Chrysoperla carnea
 Chrysoperla furcifera
 Chrysoperla mediterranea
 Chrysoperla nipponensis
 Mallada
 Mallada albofacialis
 Mallada basalis
 Mallada boninensis
 Mallada clavatus
 Mallada desjardinsi
 Mallada krakatauensis
 Mallada signata

Figure S7. Phylogenetic tree of lacewings according to NCBI taxonomy. The two species discussed in this study are indicated in bold.

7.2 Teilarbeit II

Der Inhalt dieses Kapitels wurden bereits in *Advanced Sustainable Systems* veröffentlicht als:

Jokisch, S.; **Neuenfeldt, M.** and T. Scheibel (2017). "Silk-Based Fine Dust Filters for Air Filtration".

Reproduziert aus: *Advanced Sustainable Systems*, 1, 1700079. doi: 10.1002/adsu.201700079 mit freundlicher Genehmigung des Verlages WILEY-VCH.

Silk-Based Fine Dust Filters for Air Filtration

Stephan Jokisch, Martin Neuenfeldt, and Thomas Scheibel*

State-of-the-art air filter devices have been well-characterized and optimized for particle deposition of a huge range of particle sizes. However, sustainability of the employed filter materials is usually neglected. In this study, several polymers (recombinant spider silk, recombinant lacewing silk, poly(lactic acid), and poly(ethylene oxide)) are electrospun into fine dust filter layers to evaluate relevant filter parameters such as particle deposition, air permeability, and pressure drop for sub-micrometer fiber materials. Filters comprising silk proteins show a much lower demand on fine-dust-layer material ($40\text{--}210\text{ mg m}^{-2}$) in comparison to that of conventional filters (50 g m^{-2}). Filters equipped with silk meshes with fiber diameters in the sub-micrometer regime ($<250\text{ nm}$) show improved filter qualities in comparison to that of commercially available air filter devices (with melt blown fibers in the $>20\text{ }\mu\text{m}$ regime). In particular, sub-micrometer particles ($0.2\text{--}1\text{ }\mu\text{m}$) are filtered more efficiently by the silk-based filters due to interception and impaction effects yielding a low pressure drop, and therefore these filters show an improved air permeability and lowered pressure drop of, for example, a vacuum cleaner bag in which they can be employed.

systems are increasing in numbers, most devices still employ vacuum cleaner dust bags, causing high amounts of waste. Conventional dust bags consist of several filter layers, which mostly comprise randomly deposited polymer-based melt blown macro- to microfibers.^[1] Relying on deep filtration, the performance of these bags is limited and improvement of filtration performance generally goes hand in hand with increasing layer numbers and therefore increasing pressure drop as well as energy uptake. Electrospun sub-micrometer fibers offer an excellent approach to high-performance filtration combined with high air permeability in end products such as vacuum cleaners.^[2] Sub-micrometer fibers have already previously been applied to improve the performance of air filtration systems due to their combination of high filtration capacity and low flow resistance.^[3,4] However, one side effect of using sub-micrometer fibers

1. Introduction

Nearly every household in industrial nations removes their dusty debris by vacuum cleaning. Although cyclone-based

is their high probability of getting ripped out of their matrix through frequent use, and another one could be inhalation of released fibers/particles thereof with putative health issues.^[4] Therefore, it is important that the sub-micrometer filter material is nontoxic and biodegradable. In addition, the demand for product recycling and green technologies steadily increases for modern technical devices, including dust filtration technologies.^[5] Especially for polymeric materials, a sustainable and biodegradable alternative to synthetic polymers is in the focus of research.^[6] There are several important demands for bioinspired materials, but one of the most important is biodegradability, as this allows for sustainable waste disposal. Green biopolymers made of or inspired by natural materials are therefore considered as promising candidates for different applications. Poly(lactic acid) (PLA) is a well-known example for sustainable materials and basis for a wide range of technical and/or medical applications.^[7,8] Several further biopolymers are currently under investigation, including silks of different origin.

Silk fibers have been in the focus of researchers due to their good mechanical properties, including spider silk with an extraordinary toughness or the egg stalk silk of lacewings with a high bending stiffness.^[9–12] Both silk-based materials are completely biodegradable and sustainable. However, especially access to naturally sourced spider silks is limited due to the cannibalistic and territorial behavior of most spiders hampering their large-scale farming.^[13] To overcome this hurdle, recombinant production of silk proteins has been successfully established in the past.^[12,14–16]

S. Jokisch, M. Neuenfeldt, Prof. T. Scheibel

Lehrstuhl Biomaterialien

Fakultät für Ingenieurwissenschaften

Universität Bayreuth

Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

E-mail: thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de

Prof. T. Scheibel

Bayreuther Zentrum für Kolloide und Grenzflächen (BZKG)

Universität Bayreuth

Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

Prof. T. Scheibel

Bayerisches Polymerinstitut (BPI)

Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

Prof. T. Scheibel

Bayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften (BZMB)

Universität Bayreuth

Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

Prof. T. Scheibel

Institut für Bio-Makromoleküle (bio-mac)

Universität Bayreuth

Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

Prof. T. Scheibel

Bayreuther Materialzentrum (BayMAT)

Universität Bayreuth

Universitätsstraße 30, 95440 Bayreuth, Germany

DOI: 10.1002/adsu.201700079

In this study, we wanted to evaluate sub-micrometer fiber mats made of green polymers in comparison to synthetic ones as fine-dust-filter materials. We fabricated nonwoven meshes made of poly(ethylene oxide) (PEO), poly(lactic acid) (PLA), eADF4(C16) (engineered recombinant spider silk protein), and ChryC1 (recombinant lacewing silk protein) in a sub-micrometer regime using electrospinning.^[17–19] In terms of filter performance, we could show that particle deposition in the silk-containing setup is comparable to that of conventional filter bags, but air permeability and pressure drop (i.e., relevant for the end product regarding energy uptake, e.g., in a vacuum cleaner) was significantly improved.

2. Results and Discussion

2.1. Production of Silk and Polymer Nonwoven Filter Meshes on Polyamide Supports

PEO, PLA, and the recombinant silk proteins ChryC1 (based on a silk protein derived from lacewing (*Chrysoperla carnea*) egg stalk) and eADF4(C16) (based on a silk protein derived from the dragline of the European garden cross spider (*Araneus diadematus*)) solutions were electrospun on PA supports. Based on vapor pressure of the used solvents, parameter sweeping was conducted to determine spinning heights and voltage differences for each polymer solution (see the Experimental Section: Equation (3), Table S1, Supporting Information). Since all other electrospinning parameters remained constant, dope solutions with similar viscosities resulted in fibers with similar diameters as shown in Figure 1.

Here, the recombinant lacewing silk protein ChryC1 as well as eADF4(C16) were solved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) and spun as previously published.^[20] Ethanol as well as water vapor post-treatments were carried out to induce and

maximize crucial β -sheet secondary structure. Sub-micrometer fibers from silk protein with increased α -helical and random coil structures are more fragile and dissolved by air humidity over time.^[20] Another side effect of the post-treatment is a partial resolving of the protein fibers at their surfaces causing a melting of fiber crossings upon resolidification, which strengthens the fiber networks by physical cross-links. Additionally, this effect enhances filtration capability since fiber slipping is minimized and pores remain constant in size. The analysis of the stabilizing effects of post-treatment of silk fibers has been published in previous studies and is well established.^[20,21] Importantly, fiber diameters depended on the molecular weight of the used polymers as well as the dope concentrations; the higher the molecular weight, the lower was the dope concentration to yield fibers with equal diameters.

PLA was dissolved in trichloromethane (TCM) and PEO was dissolved in water, since HFIP is not the best-performing solvent in both cases yielding neutrally charged polymers at neutral pH.^[22–25] Due to the low volatility and high surface tension of water, parameters for electrospinning of PEO had to be adjusted by increasing the working distance of the electrodes to allow sufficient evaporation of the solvent. Additionally, the voltage was adjusted yielding the necessary field strength (Table S1, Supporting Information) to gain fibers in the desired diameter range.

The choice of proper solvents and spinning setups play a crucial role for the production of homogeneous nonwoven fiber meshes made by electrospinning.^[17] Whipping effects of polymer jets during spinning lead to a chaotic fiber deposition resulting in anisotropic pores with inhomogeneous but distinct diameters per layer and spinning setup (PLA: $\bar{\phi}_p$: 7.3 ± 2.2 μm , pore fraction: 97%; PEO: $\bar{\phi}_p$: 4.7 ± 2.2 μm , pore fraction: 95.4%; ChryC1 A: $\bar{\phi}_p$: 2.9 ± 0.9 μm , pore fraction: 96.7%, B: $\bar{\phi}_p$: 2.8 ± 0.8 μm , pore fraction: 92.5%, C: $\bar{\phi}_p$: 1.8 ± 0.7 μm , pore fraction: 80.8%; eADF4(C16) A: $\bar{\phi}_p$: 3.7 ± 1.4 μm , pore

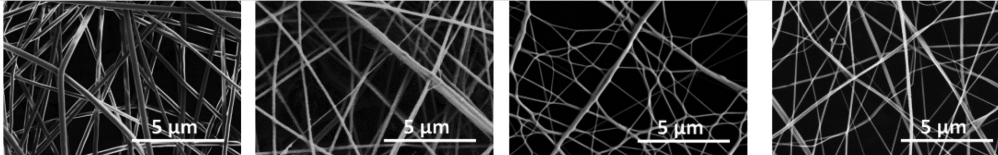
Material	PLA	PEO	ChryC1	eADF4(C16)
Molecular Weight M / kDa	39	400	84	48
Fiber Diameter $\bar{\phi}_F$ / nm	245 +/- 53	221 +/- 52	A 80 \pm 24	A 95 \pm 24
			B 205 \pm 59	B 239 \pm 49
			C 401 \pm 91	C 402 \pm 61
Pore Size $\bar{\phi}_p$ / μm	7.3 +/- 2.2	4.7 +/- 2.2	A 2.9 \pm 0.9	A 3.7 \pm 1.4
			B 2.8 \pm 0.8	B 2.3 \pm 0.9
			C 1.8 \pm 0.7	C 1.2 \pm 0.6
Surface charge at neutral pH	neutral	neutral	negative	negative
				

Figure 1. Basic information on electrospun nonwoven mats including materials, molecular weight, main fiber diameter, average pore size, surface charge at neutral pH, and exemplary SEM images.

fraction: 97.4%, B: ϕ_p : $2.3 \pm 0.9 \mu\text{m}$, pore fraction: 91.5%, C: ϕ_p : $1.2 \pm 0.6 \mu\text{m}$, pore fraction: 73.2%). Higher concentrated spinning dopes resulted in lower pore sizes since viscosity decreased and whipping effects were consequently reduced as well. In former studies, HFIP has been established as one standard solvent for electrospinning of proteins like collagen or different types of silk.^[20,23–27]

2.2. Filtration Efficiency

2.2.1. Filtration Device Setup

Uniform electrospun fiber mats were prepared as depicted in **Figure 2A,B** to reveal a basic fine dust filter layer setup. By adjusting the spinning time to alter the amount of laid down fiber meshes, filter layer deposits with different thickness were achieved. Initially, the particle deposition capability of these filter layers was tested in a dust-filled air stream (Figure 2C). For filtration tests, A2—Arizona fine test dust (ISO 12103-1) was used with particle sizes in a range of 0.2–8.9 μm .

2.2.2. Filtration Efficiency of PLA and PEO Sub-Micrometer Fibers on PA Supports

In case of PLA, the particle deposition rate reached sufficient values at a surface coverage of 210 mg m^{-2} . At fiber diameters of 200–250 nm, nonwoven PLA fiber mats showed good air permeability (**Table 1**). The higher air permeability of thinner PLA coatings is likely based on gaps between individual fibers caused by an inconsistent fiber deposition. It is reasonable to speculate that the high vapor pressure of TCM led to a rapid drying of the Taylor cone during electrospinning, causing these inconsistencies.

In contrast, PEO nonwoven mats demonstrated good air permeability, and again the highest tested surface coverage (210 mg m^{-2}) yielded reasonable particle deposition rates at very low pressure drop, which were, however, considerably below that of PLA.

2.2.3. Filtration Efficiency of ChryC1 Sub-Micrometer Fibers on PA Supports

Lacewing-silk based ChryC1 fibers were physically cross-linked by water vapor post-treatment and partial surface melting processes to prevent fiber slippage within the air flow. ChryC1-based filter layers showed good deposition rates at higher pressure drop in comparison to that of the two synthetic polymers (**Table 2**). Spinning dopes with different concentrations were electrospun yielding different fiber diameters to test the correlation between fiber diameter and particle deposition. Small fiber diameters (50–150 μm) lead to low particle deposition rates but good air permeability, while large fiber diameters (400–450 μm) yielded higher deposition rates

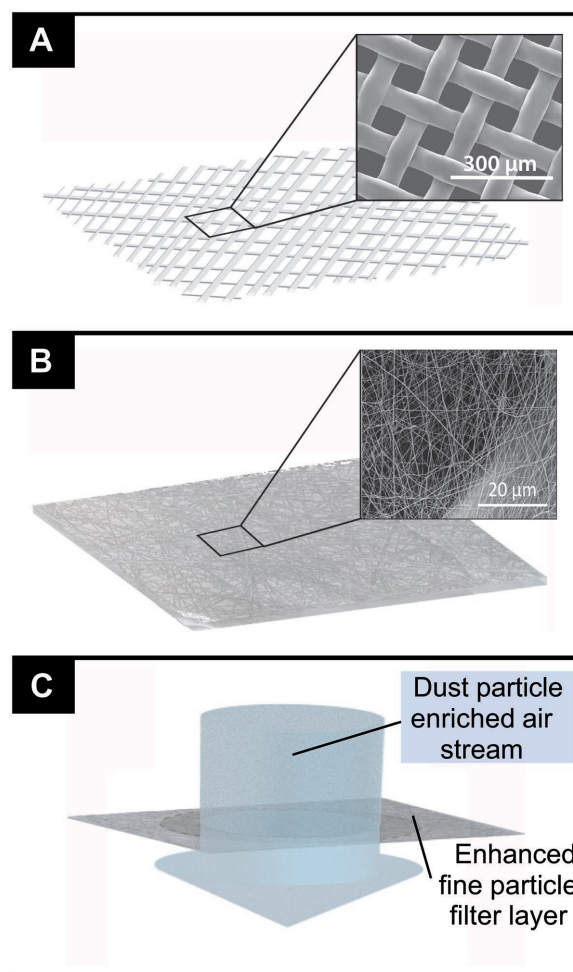


Figure 2. A) PA support woven, B) spider silk protein nonwoven mesh on support, and C) enhanced filtration efficiency test setup.

at the cost of increasing pressure drop. The combined best performance was achieved at intermediate fiber diameter and a surface coverage of 210 mg m^{-2} (**Table 2B**).

Table 1. Filtration efficiency of poly(lactic acid) (PLA, A) and poly(ethylene oxide) (PEO, B) meshes on PA supports using A2—Arizona fine test dust. Pressure drop differences Δp were determined between that of clean and dust filled filter layers.

Material	A		PLA		B		PEO	
Mean fiber diameter Ø [nm]	200 < x < 250							
Amount of layer material [mg m ⁻²]	40	100	150	210	40	100	150	210
Layer thickness LT [µm]	99	247	371	519	63	158	237	332
Calculated number of fiber mesh layers	440	1100	1649	2308	281	703	1054	1475
Air permeability [L m ⁻² s ⁻¹]	2761	2486	1671	1091	2790	2455	2077	1430
Deposition rate/retention	Ret _{0.2} [%]	28	43	51	86	13	16	22
	Ret _{0.8} [%]	25	45	51	92	14	15	29
	Ret _{3.2} [%]	41	62	73	98	17	32	48
	Ret _{8.9} [%]	65	78	88	100	45	54	74
Δp [Pa]								
	116	127	129	193	23	30	34	40

Table 2. Filtration efficiency of lacewing silk (ChryC1) fiber meshes on PA supports using A2—Arizona fine test dust. Pressure drop differences Δp were determined between that of clean and dust filled filter layers.

Material		ChryC1											
Mean fiber diameter Ø [nm]		A		50 < x < 150		B		150 < x < 250		C		350 < x < 450	
Amount of layer material [mg m ⁻²]		40	100	150	210	40	100	150	210	40	100	150	210
Layer thickness LT [µm]		90	224	337	471	38	94	142	198	13	32	48	68
Calculated number of fiber mesh layers		898	2244	3366	4713	168	419	629	880	30	75	113	159
Air permeability [L m ⁻² s ⁻¹]		2583	1919	1742	1428	1710	1326	1107	877	1579	867	783	645
Deposition rate/retention	Ret _{0.2} [%]	17	33	38	60	53	66	78	88	74	75	78	78
	Ret _{0.8} [%]	24	57	63	88	68	87	94	98	90	92	95	95
	Ret _{3.2} [%]	57	84	88	98	89	95	98	99	98	99	99	99
	Ret _{8.9} [%]	77	96	97	99	96	96	98	99	99	100	100	100
Δp [Pa]													
		26	82	89	123	96	196	227	320	183	186	200	306

2.2.4. Filtration Efficiency of eADF4(C16) Sub-Micrometer Fibers on PA Supports

Nonwoven meshes of spider silk eADF4(C16) showed good particle deposition rates using fiber diameters between 200 and 250 nm, which is consistent with previously reported results.^[20] At larger fiber diameters, an improved particle deposition was detected (Table 3C), but the pressure drop was quite high under those conditions.^[28] Similar to the other tested materials, thin fibers were not capable of sufficiently capturing dust particles. Air permeability was satisfactory for most parameter combinations. Only nonwoven mats with largest fiber diameters and highest amounts of layer material provided air permeability below the control value (Table 4, conventional filter bag, $\Delta p = 250$ Pa).

2.2.5. Filtration Efficiency of a Spider Silk-Containing Filter Bag in Comparison to That of a Conventional One

The selected setup including eADF4(C16) silk meshes yielded good particle deposition, low pressure drop, and high

air permeability. Therefore, in a next step a spider silk fine dust filter was implemented in a filter bag. A raw particle filter layer (>2 mm) was combined with an intermediate filter layer (>0.5 mm), and the final layer reflected the spider silk nonwoven mesh enhanced PA support (Figure 3A, top to bottom). The nonwoven mesh was oriented toward the inside of the stack, maintaining its mechanical integrity throughout the filtration process.

In a commercial standard vacuum cleaner equipped with filter bags, the dust particle stream is led into the core of the filter bag and further passes the upper and lower filter stacks (Figure 3B). To compare the performance of the standard vacuum bag to that of the filter setup with a spider silk nonwoven mesh, a lower “cut-in-half” filter stack was used. This setup yielded higher air permeability (Figure 4) and decreased pressure drop as well as better particle deposition throughout the whole particle range for the silk-containing filters in comparison to that of the commercial one (Table 4).

Next, a complete filter bag prototype was produced with spider silk nonwoven meshes as the fine dust filter layer (Figure 3). Two identical filter stacks were combined by

Table 3. Filtration efficiency of spider silk (eADF4(C16)) fiber meshes on PA supports using A2—Arizona fine test dust. Pressure drop differences Δp were determined between that of clean and dust filled filter layers.

Material	eADF4(C16)												
Mean fiber diameter Ø [nm]	A		50 < x < 150		B	150 < x < 250			C	350 < x < 450			
Amount of layer material [mg m ⁻²]	40	100	150	210	40	100	150	210	40	100	150	210	
Layer thickness LT [µm]	113	282	424	593	31	78	117	163	8	21	31	44	
Number of fiber mesh layers	311	776	1165	1632	138	345	518	725	73	183	274	384	
Air permeability [L m ⁻² s ⁻¹]	1396	757	492	352	1274	579	349	238	639	425	213	130	
Deposition rate/retention	Ret _{0,2} [%]	83	89	96	69	69	92	99	100	78	98	97	100
	Ret _{0,8} [%]	84	90	96	86	86	99	100	100	92	98	98	100
	Ret _{3,2} [%]	86	92	97	97	97	100	100	100	98	99	99	99
	Ret _{8,9} [%]	88	92	98	99	99	100	100	100	99	100	100	100
Δp [Pa]													
	109	163	198	295	128	241	286	453	239	370	535	869	

Table 4. Filtration efficiency of spider silk (eADF4(C16)) fiber meshes on PA support implemented in a test dust bag (Figure 3A) in comparison to that of a conventional filter using A2—Arizona fine test dust. Pressure drop differences Δp were determined between that of clean and dust filled filter layers.

Material	Conventional dust bag	eADF(C16) spider silk protein dust bag
Mean fiber diameter \varnothing [nm]		150 < x < 250
Amount of Layer material [mg m^{-2}]		100
Layer thickness LT [μm]		78
Number of fiber mesh layers		345
Air permeability [$\text{L m}^{-2} \text{s}^{-1}$]	250	503
Deposition rate/retention	Ret _{0.2} [%]	89
	Ret _{0.8} [%]	95
	Ret _{3.2} [%]	98
	Ret _{8.9} [%]	99
Δp [Pa]		
	193	115

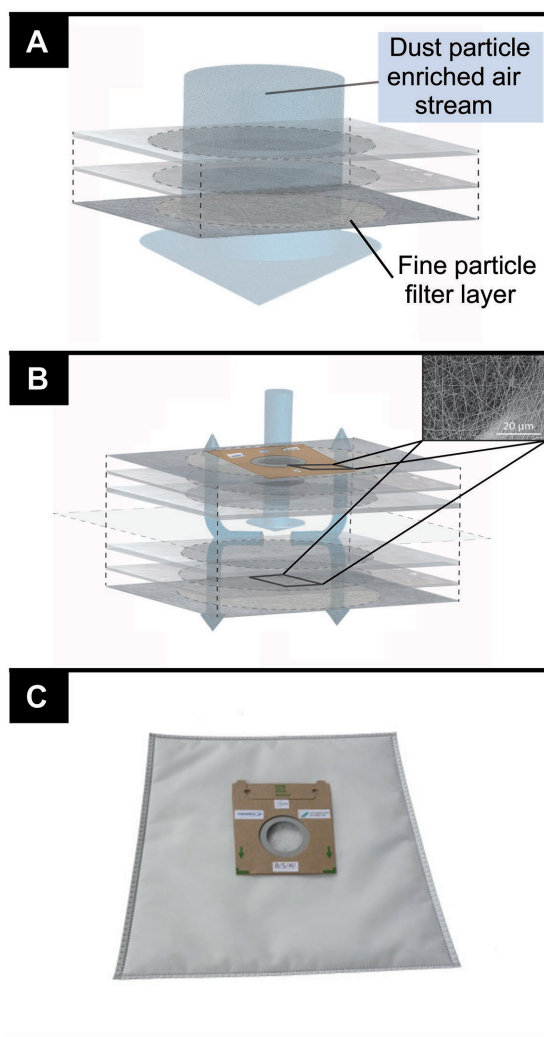


Figure 3. A) Spider silk protein enhanced vacuum cleaner dust bag setup in principle and B) reassembling a complete dust bag; C) photograph of (B).

orienting the raw particle filter layers toward each other. A hole was cut through the center of the upper stack, enabling air guidance to the core of the double stack. The edges of the layer stack were fixed using pulsed ultrasound. A paper-filter adaptor was attached to the inlet hole enabling the deployment in a conventional vacuum cleaner.

2.3. Quality Factor of Spider Silk Bags

The quality factor represents one important parameter for evaluation of filter materials by describing the particle filtration efficiency in relation to the pressure loss and, therefore, the energy uptake. This factor was first introduced by Hinds.^[29,30] Since the original formula contains the penetration value of dust particles, the equation was modified according to the setup used in our experiments. Accordingly, the quality factor QF of a filter was calculated by Equation (1) with particle deposition efficiency PD and pressure drop Δp ^[29,30]

$$\text{QF} = \ln[(\text{PD})^{-1}] \Delta p^{-1} \quad (1)$$

The quality factor was determined from ten independent efficiency values for the conventional and the spider silk filter setup. The particle filtration quality factor of a conventional dust bag with x as particle diameter ($\text{QF}_{\text{comm. bag}} = 0.003x + 0.007$), was lower than the respective quality factor of the spider silk containing filter (Figure 5). The total filter quality of the spider silk enhanced filter was nearly doubled over the whole particle size range and rose exponentially. The quality factor was approximated by Equation (2)

$$\text{QF}_{\text{silk bag}} = 0.02e^{0.13x} \quad (2)$$

2.4. Mechanisms of Particle Filtration

Fiber diameter, the gaps between them, and the surface morphology are important factors concerning particle

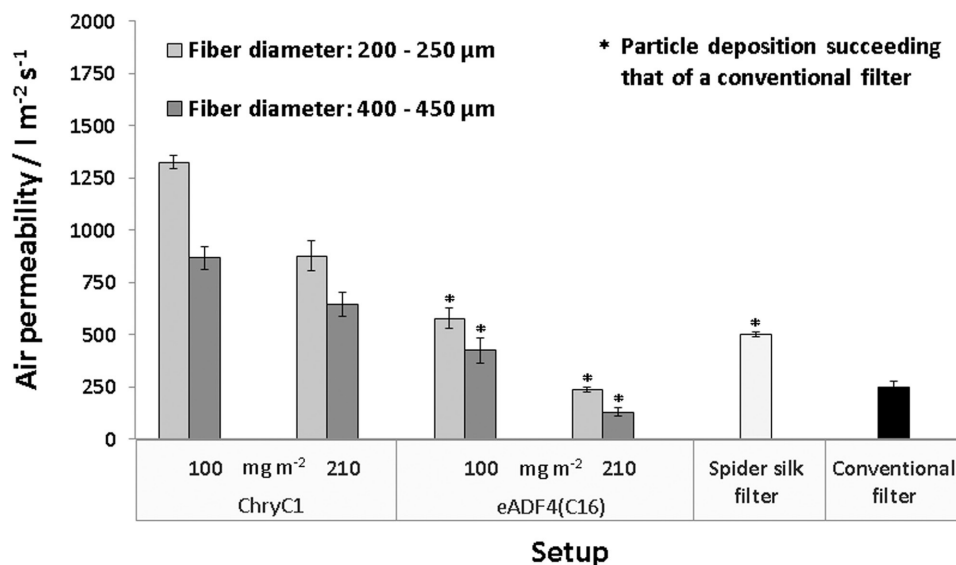


Figure 4. Air permeability of filter sheets with different silk coatings (100 and 210 mg m⁻²) in comparison to that of a complete spider silk and a conventional filter bag, respectively; ten independent samples ($n = 10$) were tested for each experimental group.

deposition. Wendorff et al. defined three main molecular processes contributing to filtering effects: interception, impaction, and particle diffusion.^[19] For interception, particles follow stream lines around the fibers and are caught on the surface when passing in a distance not larger than the particle diameter. In contrast, impaction occurs if sufficiently small particles, carried by stream lines, additionally come into contact with the fiber surface due to diffusive motion. In the used dust-stream face velocity of 25 cm s⁻¹, interception and particle diffusion are the main filtering factors for dust particles between 200 nm and 1 μm. Particles > 1 μm are mainly filtered by interception and impaction on the fiber surface. Fiber meshes made of small diameter fibers generally possess an increased specific

surface area which should theoretically enhance their deposition capacity, since particles have a higher tendency to experience impaction. Yet, smaller fibers also generate larger gaps in between the meshes, allowing small particles to pass through more easily, which could be confirmed with the silk-based filters. The diffusive filtration of nonwoven mesh coatings in addition to the impaction capabilities of nonwoven mesh fibers with larger diameters yielded the highest particle deposition rates. However, when dense nonwoven meshes are used, the formation of a filter cake is enhanced blocking the air stream and resulting in high-pressure drop rates. Thus, dense nonwoven fiber meshes are inefficient concerning energy consumption. Instead, intermediate-sized spider silk fiber diameters (200 nm < x < 250 nm) and moderate layer thickness (100 mg m⁻²) provide both good particle deposition and low pressure loss.

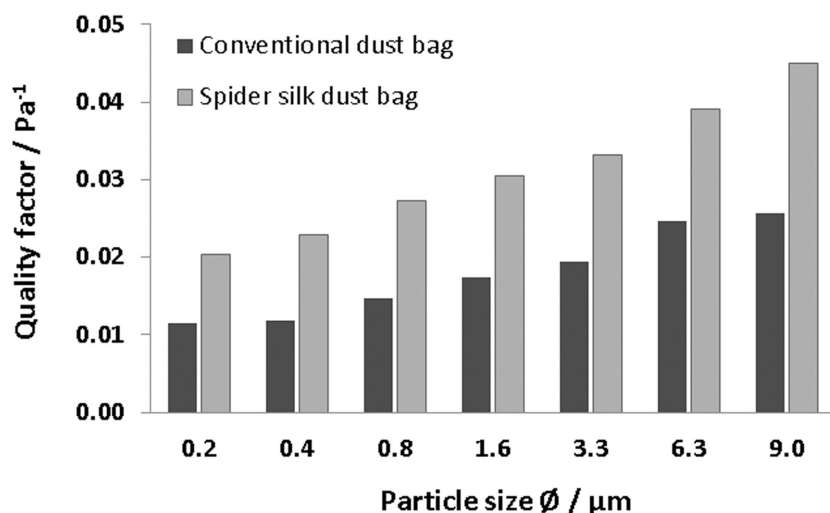


Figure 5. Quality factor of a spider silk-containing filter setup in comparison to that of a conventional one, using the particle deposition for each particle size and the pressure drop; ten independent samples ($n = 10$) were tested for each experimental group.

3. Conclusion

Four different sub-micrometer fiber mats based on the synthetic polymers PEO and PLA and two biopolymers, namely, recombinant silk protein ChryC1 and eADF4(C16), were tested regarding their applicability as fine dust particle filter meshes and compared, for example, concerning their filter efficiency. This approach contrasts standard ones using melt-blown fiber mats, for example, made of polypropylene with individual fiber diameters >20 μm. Nonwoven fiber meshes with different fiber diameters were successfully electrospun on PA woven used as a support. A clear dependency of the filtration efficiency on material, fiber diameter, and coating

thickness could be determined. Lacewing and spider silk fiber meshes exceeded the performance of the synthetic polymers in filtration tests. Furthermore, spider silk meshes were the best material tested concerning the considered values of particle deposition, air permeability, and pressure drop. Their negative surface net charge might contribute to the better performance of spider silk nonwoven meshes (highest negative surface charge). A novel silk-containing filter setup was established (Figure 3B,C), based on the best performing fine particle filter layer, providing a significantly higher filtration quality factor than a conventional filter bag. Importantly, in this setup only the fine-dust-filter layer is exchanged for a silk-containing one, but there might be room to also replace other layers of a dust filter bag. In summary, a silk-containing filter system might allow to lower the energy uptake due to improvement of air permeability and filtration efficiency of filter applications (i.e., end consumer/machine used) as well as their sustainability.^[31]

4. Experimental Section

All chemicals were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany) and Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) at p.a. quality, if not stated otherwise. Conventional dust filter bags were purchased from MicrofiltPlus (AEG AE120, Frankfurt am Main, Germany).

Recombinant Production of ChryC1 Lacewing and eADF4(C16) Spider Silk Proteins: Recombinantly engineered *A. diadematus* fibroin 4 (eADF4(C16), Figure S1, Supporting Information) was purchased from AMSilk GmbH (Munich, Germany).^[32] *C. carnea* (ChryC1, Figure S2, Supporting Information) lacewing silk protein was produced in *Escherichia coli* BL21-Gold (DE3) pLysS from Novagen (Madison, WI), and gene expression was induced by adding 0.5×10^{-3} M isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) at an optical density (600 nm) between 3.0 and 3.5. Cells were harvested after expression for 4 h at 30 °C. After cell disruption, the lysate was treated with heat (80 °C for 20 min), acetic acid (pH 4.2 for 2 h), and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (fractional precipitation by using 0.8 and 1.5 M final concentration). The obtained pellets were washed with 1.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25×10^{-3} M sodium phosphate, pH 8.0, solubilized in 6 M guanidinium thiocyanate (GdmSCN), dialyzed against 10×10^{-3} M NH_4HCO_3 , and lyophilized.

Characterization of Spinning Dopes: The (bio-) polymer solutions were characterized using a rotational rheometer (AR-G2, TA Instruments Ltd., Crawley, Great Britain) and a cone-plate system (diameter: 40 mm, 0.5°) with a flow procedure (logarithmic shear ramp from 2.86 to 286.4 s⁻¹) and ten collected points per decade at 25 °C. The viscosities of the different polymer dopes were adjusted in order to electrospin fibers with equal dimensions. All dopes were adjusted to possess the same shear rate of 190 s⁻¹, and the collection rate was kept constant at 33 m s⁻¹ throughout the whole spinning process (Table S2, Supporting Information).^[27]

Electrospinning: Sub-micrometer fiber nonwoven meshes based on PEO (400 kDa), PLA (39 kDa, Toray GmbH, Düsseldorf, Germany), recombinant spider silk protein eADF4(C16) (48 kDa), and recombinant lacewing silk protein ChryC1 (82 kDa) were electrospun using a constant flow rate of 4.4 $\mu\text{L min}^{-1}$ for all dope solutions. The electric field strength combining the voltage difference between both electrodes and the spinning height were both set individually for each material and dope concentration (Table S1, Supporting Information) according to Equation (3)

$$\vec{E} = U h^{-1} [\text{kV mm}^{-1}] \quad (3)$$

To provide a homogeneous coating, the electrospinning device was equipped with an x-y-axis movable spinning head. Each filtration efficiency data set was determined by measuring three equally made

filters. Both silk materials were dissolved in HFIP, PEO was dissolved in ultrapure water (MilliQ, Merck Millipore, Darmstadt, Germany), and PLA in TCM (chloroform) to achieve dope solutions. All solutions were shaken for 48 h and transferred into 1 mL syringes (Braun, Inkjet 0.01–1 mL) serving as dope reservoir connected to blunt grinded cannulas (Sterican, 19G×2", 30 mm) used as spinning electrode. A rectangular table (1100 mm × 60 mm) acted both as counter electrode and collector table for the sub-micrometer fibers which were spun onto a polyamide support mesh with a gap width of 80 μm (PA-80/105, Schwegmann Filtrations-Technik, Grafschaft-Gelsdorf, Germany).

Ethanol vapor post-treatment was carried out to induce crystalline structures and stabilize the nonwoven mats.^[20,33] Spider silk protein (eADF4(C16)) fiber meshes were stored in ethanol atmosphere at 60 °C for 180 min, and ChryC1 fiber meshes were stored in 100 % (RH) (water vapor) at 30 °C for 16 h.

Assembly of a Spider Silk-containing Filter System: eADF4(C16) was spun out of HFIP on 625 cm² PA with a surface coverage of 100 mg m⁻². The silk-coated PA support was combined with two stacks of raw particle filters (>2000 μm , polyester stacked fleece, Sandler AG, Schwarzbach a. d. Saale, Germany) and an intermediate size particle filter (>500 μm , polypropylene spun bond fleece, Sandler). The raw particle filter layers were facing each other in this setup. The fine particle filter layers formed the outer layer of the final setup with the nonwoven coated sides facing to the inside (Figure 3A,B). A hole was punched through the upper stack and finished with a paper air inlet. The stacks were fixed using an ultrasound welding device. Afterward, filters were cut to 400 cm² size. Thus, placed in a vacuum cleaner with a proper dust bag socket, the air stream reached the bags core, passing first the raw particle filter, then the intermediate particle filter, and finally the spider silk covered PA woven mat (Figure 3C).

Characterization of Electrospun Filter Meshes: Scanning Electron Microscopy (SEM): The fiber meshes were characterized using scanning electron microscopy at a voltage of 3 kV (SEM, Gemini, Sigma 300 VP/1540 ESB Cross Beam, Zeiss). All samples were sputtered with platinum by vacuum evaporation for 2 min.

Filtration Performance Test: All filter setups were tested in triplicate (Figures 2B and 3A). Air permeability of the filter layers was determined using an Akustron air permeability tester (ALD-150, Rycobel). Measurements were performed at a constant pressure drop of 200 Pa with clean air in a range of 30–3000 L m⁻² volumetric air stream. The arithmetic mean of air permeability values was determined from ten different spots per filter layer. Particle deposition was evaluated using a Palas MFP 2000 particle analyzer. Fine dust (A2—Arizona fine test dust, ISO 12103-1, PTI Powder Technology Inc.) was used with particle sizes ranging from 0.2 to 8.9 μm . Filters of 28.3 cm² testing surface were analyzed using 300 mg m⁻³ of dust. The inflow velocity was set to 25 cm s⁻¹ for 30 s leading to a total dust volume of 42.5 L min⁻¹. The pressure drop was determined automatically between clean and dust-filled filter layers to maintain the constant inflow velocity.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

Funding was derived from Technology Alliance of Upper Franconia (TAO), Bavarian State Ministry of the Environment and Consumer Protection ("Biotech high performance fibers and nonwovens," Grant No. FKZ 01RB0710A-D and U8793-2012/6-2) and European Union ("Green bio-based polymers," Grant No. 123). The authors would like to thank Alexander Kern and Prof. Hans-Werner Schmidt (Macromolecular Chemistry I, University of Bayreuth) for helping with particle deposition measurements, Claudia Stemmann and Dr. Hendrik

Bargel for performing SEM, as well as Elise DeSimone for proofreading. Furthermore, the authors gratefully acknowledge the material supply and scientific support of Lorenz Summa (Sandler AG) as well as the technical support of Harald Boeck (Bosch Siemens Hausgeräte, BSH).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords

air filtration, biodegradable polymers, lacewing silk, spider silk, sub-micrometer fibers

Received: May 24, 2017

Revised: July 19, 2017

Published online:

- [1] Z. Zhang, *Dual media vacuum filter bag*, Google Patents, **2000**.
- [2] S. Sundararajan, K. L. Tan, S. H. Lim, S. Ramakrishna, *Procedia Engineering*, **2014**, 75, 159.
- [3] X. H. Qin, S. Y. Wang, *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, 102, 1285.
- [4] A. Genaidy, T. Tolaymat, R. Sequeira, M. Rinder, D. Dionysiou, *Sci. Total Environ.* **2009**, 407, 3686.
- [5] A. L. Craighill, J. C. Powell, *Resour., Conserv. Recycl.* **1996**, 17, 75.
- [6] C. Baillie, R. Jayasinghe, *Green Composites: Polymer Composites and the Environment*, 1st ed., CRC Press, Boca Raton, FL, USA **2004**, 320.
- [7] E. Castro-Aguirre, F. Iniguez-Franco, H. Samsudin, X. Fang, R. Auras, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2016**, 107, 333.
- [8] W. Xu, R. Shen, Y. Yan, J. Gao, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2016**, 65, 428.
- [9] J. G. Hardy, L. M. Romer, T. R. Scheibel, *Polymer* **2008**, 49, 4309.
- [10] J. M. Gosline, P. A. Guerette, C. S. Ortlepp, K. N. Savage, *J. Exp. Biol.* **1999**, 202, 295.
- [11] S. Weisman, S. Okada, S. T. Mudie, M. G. Huson, H. E. Trueman, A. Sriskantha, V. S. Haritos, T. D. Sutherland, *J. Struct. Biol.* **2009**, 168, 467.
- [12] F. Bauer, L. Bertinetti, A. Masic, T. Scheibel, *Biomacromolecules* **2012**, 13, 11.
- [13] M. Modanu, L. D. X. Li, H. Said, N. Rathitharan, M. C. S. Andrade, *Behav. Processes* **2014**, 106, 12.
- [14] D. Huemmerich, U. Slotta, T. Scheibel, *Appl. Phys. A* **2006**, 82, 219.
- [15] M. Heim, D. Keerl, T. Scheibel, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48, 3584.
- [16] A. Heidebrecht, T. Scheibel, *Adv. Appl. Microbiol.* **2013**, 82, 115.
- [17] C. J. Luo, M. Nangrejo, M. Edirisinghe, *Polymer* **2010**, 51, 1654.
- [18] L. Persano, A. Camposeo, C. Tekmen, D. Pisignano, *Macromol. Mater. Eng.* **2013**, 298, 504.
- [19] J. H. Wendorff, S. Agarwal, A. Greiner, *Electrospinning: Materials, Processing, and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany **2012**, 241.
- [20] G. Lang, S. Jokisch, T. Scheibel, *J. Vis. Exp.* **2013**, 75, e50492.
- [21] A. Heidebrecht, L. Eisoldt, J. Diehl, A. Schmidt, M. Geffers, G. Lang, T. Scheibel, *Adv. Mater.*, **2015**, 27, 2189.
- [22] G. Lang, B. R. Neugirg, D. Kluge, A. Fery, T. Scheibel, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, 9, 892.
- [23] D. Keerl, T. Scheibel, *Green Mater.*, **2014**, 2, 11.
- [24] X. H. Zhang, M. R. Reagan, D. L. Kaplan, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, 61, 988.
- [25] R. Casasola, N. L. Thomas, A. Trybala, S. Georgiadou, *Polymer* **2014**, 55, 4728.
- [26] K. S. Rho, L. Jeong, G. Lee, B. M. Seo, Y. J. Park, S. D. Hong, S. Roh, J. J. Cho, W. H. Park, B. M. Min, *Biomaterials* **2006**, 27, 1452.
- [27] G. Lang, *Ph.D. Thesis*, University Bayreuth, Germany **2015**.
- [28] H. A. Nielsen, *US7987550 B2*, **2006**.
- [29] W. C. Hinds, *Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles*, 2nd ed., Wiley, New York **1999**, 483.
- [30] K. M. Yun, C. J. Hogan, Y. Mastubayashi, M. Kawabe, F. Iskandar, K. Okuyama, *Chem. Eng. Sci.* **2007**, 62, 4751.
- [31] A. Y. Lauterbach, T. Scheibel, *Green Mater.* **2015**, 3, 15.
- [32] D. Huemmerich, C. W. Helsen, S. Quedzuweit, J. Oschmann, R. Rudolph, T. Scheibel, *Biochemistry* **2004**, 43, 13604.
- [33] K. Spiess, A. Lammel, T. Scheibel, *Macromol. Biosci.* **2010**, 10, 998.



Supporting Information

for *Adv. Sustainable Syst.*, DOI: 10.1002/adsu.201700079

Silk-Based Fine Dust Filters for Air Filtration

*Stephan Jokisch, Martin Neuenfeldt, and Thomas Scheibel**

Supporting information

Silk-based fine dust filters for air filtration

Stephan Jokisch, Martin Neuenfeldt and Thomas Scheibel

S1 Recombinant silk protein sequences

eADF4(C16)

MASMTGGQQMGRGSMGSSAAAAAAASGPGGYGPENQGPSGPGGYGPGGPGSSAAAAAA
 AASGPGGYGPENQGPSGPGGYGPGGPGSSAAAAAAASGPGGYGPENQGPSGPGGYGPGGP
 GSSAAAAAAASGPGGYGPENQGPSGPGGYGPGGPGSSAAAAAAASGPGGYGPENQGPSG
 PGGYGPGGPGSSAAAAAAASGPGGYGPENQGPSGPGGYGPGGPGSSAAAAAAASGPGGY
 GPENQGPSGPGGYGPGGPGSSAAAAAAASGPGGYGPENQGPSGPGGYGPGGPGSSAAAA
 AAASGPGGYGPENQGPSGPGGYGPGGPGSSAAAAAAASGPGGYGPENQGPSGPGGYGPGG
 PGSSAAAAAAASGPGGYGPENQGPSGPGGYGPGGPGSSAAAAAAASGPGGYGPENQGPS
 GPGGYGPGGPGSSAAAAAAASGPGGYGPENQGPSGPGGYGPGGPGSSAAAAAAASGPGG
 YGPENQGPSGPGGYGPGGPGSSAAAAAAASGPGGYGPENQGPSGPGGYGPGGPGSSAAAA
 AAAASGPGGYGPENQGPSGPGGYGPGGP

Figure S1: Amino acid sequence of eADF4(C16); underlined sequence comprises the T7-tag.

ChryC1

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMYGGQWGRGSMGGCNVIAIPTASCGDSGSGSGSASS
 GAASGAASGGAASGGAASGSGSAAASGAASGSGSAAGSGAASGSGSAAGSGAASGSGSA
 AGSGAASGSGSAAGSGAASGSGSGSSSSGSSSGCGGGSGSASSGGSSASATKNSAGAS
 SNGSSAGASNGSAGASSGGSSASATKNSAGASSGSSSAGASNGSAGASSCGSSATATKNSAG
 ASSGGSTAGASNGSAGASSGGSSSSATKNSAGASSNGSSAGASNGSAGASSGGSSSSATQNSA
 GASSNGSSAGASNGSAGASSGGSSSSATQNSAGASSNGSSAGASNGTAGASSGGSSSSATKES
 AGASSNGSTATASKDSAGASSGGSSVGATASGAGAASGGSVSSATKNSSAASSQGSSVISNG
 VVSAASNGATTAGAGSASSASGGSSANVGGGSASGSSNGATSSANGSSASGSSGGSSSSAGA
 GSASGSSGNSSSSASGNTASGSSGDSSSSAGSGTASGSSGGATSTAGSGSASGSSGSSSSSAGSG
 SASGSSGNSSSSASGGTASGSSNGATSSAGSGTASGSSGGSSSSAGSGTASGSSGDSSSSAGSGS
 ASGSSGGATSSAGSGSASGSSGNSSSSAGSGSASGSSGDSSSSAGSGSASGSSGGATSTAGSGS
 ASGSSGNSSSSAGSGSASGSSGDSSSSAGSGSASGSSGGASSAGSGSASGSSCGSTSGASSGSA
 SGSSGGSSSSAGSGSASGASGSSSAAGSGSASGSSGGSTSGASCGSASGSSGDSSSSAGSGSA
 SGSSGGASSAGSGSASGSSGGSTSGASSGASGSSGGSSSSAGSGSASGASAGSSSAAGSGSA
 SGSSGGSSSGASSGSSDGCSSGGSSGAASGAASGSGSASGSGAASGSGAASGSGAASGSGAAS
 GSGAASGSGAASGSGAASGSGSASGLSAASSGAASSGSAAGSGSASGSGSAASSGAASSSG
 SAAGSGSASVSGSSDDSDDCSC

Figure S2: Amino acid sequence of Chry(C1); underlined sequence comprises the His6-tag and a mutated T7-tag (His6-T7mut).

S2 Comparison of field strength

To achieve a continuous taylor cone at the tip of the spinning needle, polymer concentration, voltage, spinning distance and humidity were adjusted for each polymer. Subsequently, the ideal spinning distance for each dope concentration was evaluated by alternating the collector electrode distance until a nonwoven mat radius of 60 mm was gained within 5 s of spinning time. The voltage difference was taken into consideration with alternating spinning distances. The relative humidity was set to 50 % (RH) in case of PLA, PEO and recombinant spider silk protein eADF4(C16), and 30 % (RH) for recombinant lacewing silk protein (ChryC1) during the electrospinning process.

Table S1: Evaluation of the electrospinning field strength to be used for the four tested polymers

Collector distance Δh /mm		50	75	100	125	150	175	200	250	300	350	400
Dope concentration c /g l ⁻¹	ΔU /kV	Electric field strength \bar{E} /kV mm ⁻¹										
CryC1 82 kDa	50	10.0			0.10							
	70	12.5	0.25	0.17	0.13	0.10	0.08	0.07	0.06			
	90	15.0			0.15							
eADF4(C16) 48 kDa	60	10.0				0.08						
	100	15.0	0.30	0.20	0.15	0.12	0.10	0.09	0.08			
	140	25.0				0.16						
	180	20.0				0.20						
	20	10.0						0.08				
PLA 39 kDa	60	12.5	0.25	0.17	0.13	0.10	0.08	0.10	0.06			
	100	15.0						0.12				
	140	17.5						0.14				
	180	20.0						0.16				
	210	22.5						0.18				
	25	22.5									0.06	
PEO 400 kDa	30	25.0									0.07	
	35	27.5				0.18	0.14	0.11	0.09	0.08	0.07	
	40	30.0									0.09	
	45	32.5									0.09	
	50	35.0									0.10	

S3 Rheological characterization of spinning dopes

All polymer dope solutions used for electrospinning were rheologically characterized using a rotational rheometer (AR-G2, TA Instruments Ltd., Crawley, Great Britain) and a cone-plate system (diameter: 40 mm, 0.5 °) with a flow procedure (logarithmic shear ramp from 2.86 s⁻¹ to 286.4 s⁻¹) and 100 collected points at 25 °C.

Table S2: Mean viscosity of spinning dopes at a raising shear ramp

Shear rate $\dot{\gamma}$ / s ⁻¹	Mean viscosity μ / Pa s						
	TCM	water	HFIP	PLA 60 g l ⁻¹	PEO 35 g l ⁻¹	ChryC1 70 g l ⁻¹	eADF4(C16) 100 g l ⁻¹
7	1.8*10 ⁻³	1.2*10 ⁻³	4.0*10 ⁻³	1.3*10 ⁰	1.6*10 ⁰	1.1*10 ⁻¹	1.0*10 ⁻²
18	8.0*10 ⁻⁴	1.1*10 ⁻³	2.8*10 ⁻³	2.0*10 ⁻¹	1.4*10 ⁰	1.1*10 ⁻¹	4.3*10 ⁻³
36	9.0*10 ⁻⁴	1.1*10 ⁻³	2.5*10 ⁻³	8.9*10 ⁻¹	1.3*10 ⁰	0.8*10 ⁻¹	1.0*10 ⁻²
90	7.4*10 ⁻⁴	1.1*10 ⁻³	2.1*10 ⁻³	3.6*10 ⁻¹	9.7*10 ⁻¹	0.8*10 ⁻¹	1.1*10 ⁻²
190	7.1*10 ⁻⁴	1.1*10 ⁻³	2.0*10 ⁻³	1.9*10 ⁻¹	7.5*10 ⁻¹	0.9*10 ⁻¹	1.1*10 ⁻²
286	7.0*10 ⁻⁴	1.1*10 ⁻³	1.8*10 ⁻³	1.3*10 ⁻¹	6.1*10 ⁻¹	0.9*10 ⁻¹	1.1*10 ⁻²

7.2 Teilarbeit III

Der Inhalt dieses Kapitels wurden bereits in *Insect Molecular Biology and Ecology* veröffentlicht als:

Neuenfeldt, M. and T. Scheibel (2014). "Silks from Insects - From Natural Diversity to Applications".

Reproduziert aus: *Insect Molecular Biology and Ecology*, CRC Press 2014, pp. 376-400 mit freundlicher Genehmigung des Verlages CRC Press.

13

Silks from Insects—From Natural Diversity to Applications

M. Neuenfeldt^a and T. Scheibel^b

Introduction

During evolution, silk has evolved multiple times (Sutherland et al. 2010). Since all known silks are heterogeneous in both molecular structure and biological function, it is difficult to postulate a distinct definition of silk: Silk belongs to the family of structural extracorporeal proteins with highly repetitive sequences (Craig 1997), which are processed starting with a concentrated silk solution. This definition excludes, e.g., hair which is fabricated out of low concentrations of keratin. Further, silk glands are required to store the concentrated silk dope. In particular, silks are fibers, which distinguish them from other secreted structural proteins such as glue produced by marine organisms (Waite 2002). On a molecular level, a specific characteristic of silk is the semicrystalline structure, based on a distinct amino acid sequence (Craig 1997). The crystallites contribute to the unique mechanical properties of silk (Porter and Vollrath 2009). Throughout all known silk types, the fraction of crystalline structures varies from low to high amounts (Walker et al. 2013). Finally, a spinning process is associated with silk, which describes a highly controlled phase transition of the liquid silk dope towards a solid fiber induced by shear forces (Porter and Vollrath 2009, Greving et al. 2012). In most cases, these

Lehrstuhl Biomaterialien, University of Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany.

^a Email: martin.neuenfeldt@bm.uni-bayreuth.de

^b Email: thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de

shear forces are applied within the organism's body, and the proteins are assembled in form of a fiber. However, the spinning process can also take place after the excretion of the silk dope (Weisman et al. 2009, Ashton et al. 2012); therefore, the assembly trigger can be generalized as rheological stress.

Silks are only produced by arthropods; the silkworm (larva of *Bombyx mori*) and spiders (Araneae) are probably the most prominent producers of silk (Zhou et al. 2001, Vepari and Kaplan 2007, Heim et al. 2010). In marine systems, secreted structural proteins often function as glue and are widely produced by mollusks and annelids (Silverman and Roberto 2007, Stewart et al. 2011). In contrast, only few examples of aquatic silks are known, e.g., the marine silk of amphipods (Kronenberger et al. 2012), or the insect silk produced under water by the larvae of midges and caddisflies (Case et al. 1997, Stewart and Wang 2010). The major types of silks are produced in terrestrial environments, and during evolution an impressive variety of different silks has emerged especially within the class of insects (Sutherland et al. 2010).

Since ancient times mankind has been fascinated by silk, originating in its esthetic appearance and its unique mechanical properties. Silk can possess a combination of different mechanical characteristics leading to a very high toughness; therein, it is superior to all known synthetic fibers (Heidebrecht and Scheibel 2013, Table 1). Within the last decades, the emerging field of biotechnology offered the opportunity to recombinantly produce silk proteins and materials thereof (Scheibel 2004, Omenetto

Table 1. Mechanical properties of selected insect silks compared to spider silk and other materials. n.d.: not determined (Adapted from Hepburn et al. 1979, Bauer and Scheibel 2012, Heidebrecht and Scheibel 2013).

Material	Young's modulus [GPa]	Strength [MPa]	Extensibility [%]	Toughness [MJ/m ³]
<i>Bombyx mori</i> cocoon	7	600	18	70
<i>Chrysopa carnea</i> egg stalk (30% relative humidity)	5.8 ± 1.3	68 ± 19	2 ± 1	1.2 ± 0.72
<i>Chrysopa carnea</i> egg stalk (70% relative humidity)	3.2 ± 1.0	155 ± 75	210 ± 100	87 ± 49
<i>Apis mellifera</i> cocoon	n.d.	0.4	204	n.d.
<i>Araneus diadematus</i> dragline	6	700	30	150
Elastin	0.001	2	15	2
Nylon 6.6	5	950	18	80
Kevlar 49	130	3600	2.7	50
Steel	200	1500	0.8	6
Carbon fiber	300	4000	1.3	25

and Kaplan 2010). At the end of this chapter, an overview of possible applications of silk products is described.

Molecular Insights into Insect Silk

All known insect silk proteins have glycine, serine and alanine residues as the most abundant amino acids in common. These three amino acids exhibit an intermediate hydrophobicity, ensuring a sufficient solubility of the silk proteins in the silk gland, yet leading to a high insolubility in their ordered functional state as a fiber (Sutherland et al. 2010).

In proteins, the amino acid sequence (primary structure) can fold into ordered structural elements with defined secondary structures, and further into tertiary and quaternary structures. In silk crystallites are five types of ordered structure: Coiled coil, extended beta sheet, cross beta sheet, collagen triple helix and polyglycine II (cf. Fig. 1). Beta strands are often arranged as extended sheets, but in some cases, the strands are connected by beta turns and, thus, generate consecutive sheets which are arranged perpendicular to the fiber axis (cross beta structure), being better known from, e.g., neurodegenerative diseases, where these structures cause the formation of amyloid fibrils (Jahn et al. 2010). Probably due to their potential to form amyloids, cross beta sheets are far less common in nature as a functional structure (Weisman et al. 2009). So far, only in capture threads of glowworms (*Arachnocampa luminosa*), in cocoons of weevils (*Hypera* spp.), in silken rafts of water beetle eggs (*Hydrophilus piceus*) as well as in egg stalks of lacewings (*Mallada signata*), cross beta structures have been detected (Parker and Rudall 1957, Kenchington 1983, Weisman et al. 2009). Although collagen itself is not considered to be a silk, there are a few examples of insect silks with collagen-like helical assembly, e.g., in sawflies (Sehnal and Sutherland 2008).

During evolution, several amino acid motifs have evolved, which fulfill the premises of each structural element. The formation of coiled coils only occurs when the individual alpha-helices contain repeats of seven amino acids (called heptad motif). This motif shows the general pattern HPPHPPP, where H reflects in general hydrophobic residues and P in general polar residues (Sutherland et al. 2012). Furthermore, beta strands can be formed by recurring amino acid motifs such as GAGAGS¹ or poly-alanine regions, both found in antiparallel beta-sheets of two different silkworm fibroins (Yukuhiro et al. 1997, Wilson et al. 2000). The selection of amino acids present in beta sheets is adjusted to proper interactions between the side chains, which ensure the stability of the whole structural element (Smith and Regan 1995). Additionally, beta

¹ all amino acids stated in the text are according to the IUPAC single letter code.

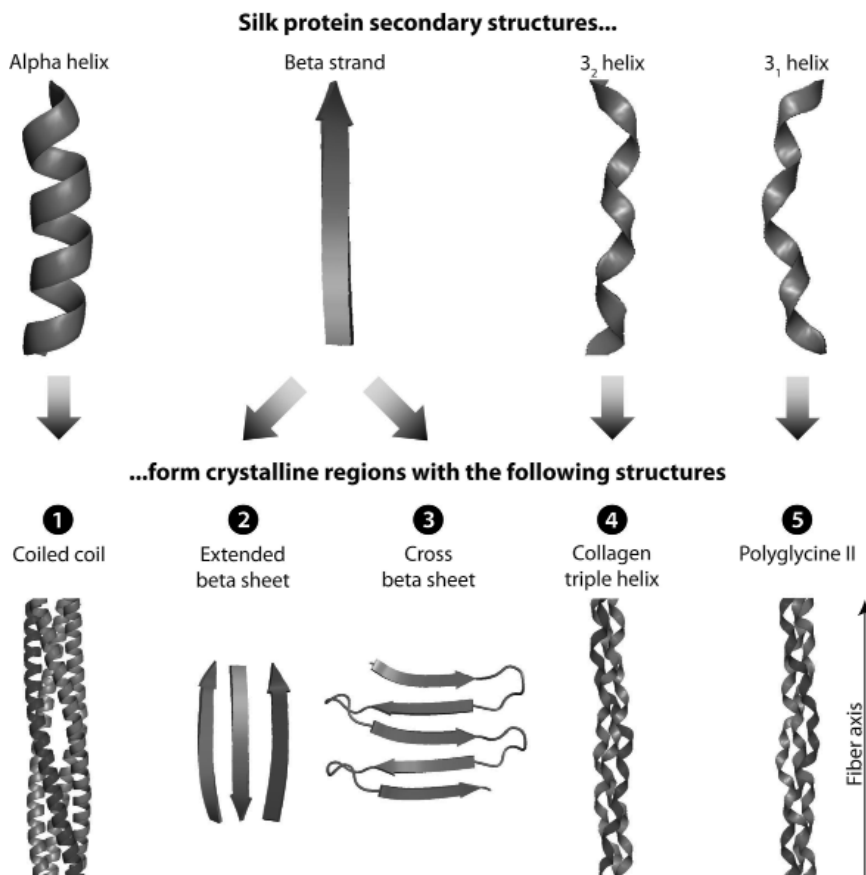


Figure 1. The five types of ordered silk structures. 1. Coiled coil: Two to five alpha helices (always right-handed) wind around each other to form a superhelix. 2. Extended beta sheet: Multiple planar beta strands form sheets which are stacked face to face. 3. Cross-beta sheet: Beta strands of uniform length alternating with turns at which the protein chain direction reverses. This is the only structural element which is aligned perpendicular to the fiber axis. 4. Collagen triple helix: Three left-handed helices with three amino acids per turn (3_2 helix) are intertwined to form a superhelix. 5. Polyglycine II: Three right-handed helices with three amino acids per turn (3_1 helix) are intertwined to form likewise a superhelix. (Adapted from Sutherland et al. 2010).

Color image of this figure appears in the color plate section at the end of the book.

strands can be connected by beta turns which are always represented by four amino acids (Hutchinson and Thornton 1994). Finally, proteins with a repetitive GX_1X_2 - (with proline as most probable residue at position X_1) or GGX_2 -motif will fold into triple-helical structures yielding a collagen-like or polyglycine II structure, respectively (Wilson et al. 2000, Sutherland et

al. 2013). Polyglycine II helices are able to assemble into hexagonal arrays (Crick and Rich 1955).

Some amino acids exert a bigger influence on structural elements than others: Due to the steric constraint of the pyrrolidine ring, proline residues disfavor the formation of alpha helices and beta sheets and induce random coil structures and turn elements instead (Liu et al. 2008). Due to their bulky sidechains, aromatic amino acids can also impede the formation of densely packed ordered structures.

Glycine residues exhibit ambivalent properties in inducing either ordered or unordered structures (Dicko et al. 2008). On the one hand, they allow a conformational flexibility of the protein chain, but on the other hand, depending on their neighboring amino acids, they can also induce amyloid-like structures (Rauscher et al. 2006).

The Relation between Structure and Biological Function of Silk

As mentioned above, the existence of crystalline elements is one of the key characteristics of silk. These crystalline regions are responsible for the resulting strength of the silk fiber, whereas unordered regions (random coil) contribute to flexible, amorphous properties.

In both ordered and unordered fractions hydrogen bonds are of major importance for the mechanical properties: In crystalline regions, hydrogen bonds exist between amide groups (Porter and Vollrath 2009). The resulting densely packed crystals exhibit a pronounced resistance against applied forces (observed as strength on a macroscopic level). Even when breaking these hydrogen bonds, the repetitive domains expose hidden length allowing the fiber to dissipate additional strain energy (Ashton et al. 2013). In contrast, random coil elements can be hydrated by water molecules. This lowers the glass transition temperature of the region and imparts silk with elastomeric properties (Porter and Vollrath 2008). Incidentally, this hydration depicts an important difference between natural silk and conventional synthetic fibers (e.g., nylon). The combination of strength and elasticity results in exceptional high values of toughness, which illustrates the unique mechanical properties of silk (Table 1).

Posttranslational modifications can induce further interesting properties of silk. For example, phosphorylation of side chains represents a common modification of silk (Chen et al. 2010, Ashton et al. 2012). In Trichoptera, the extensively phosphorylated serine residues of H-fibroin increase the adhesive character of the silk and, thus, adapt the material to the aqueous environment. Especially in such polyionic protein systems, inorganic counter ions such as Ca^{2+} may play an important role (Stewart and Wang 2010). In collagen-like silk, hydroxyproline is not present, although it is abundant in real collagen to stabilize the triple helix. Instead,

hydroxylysine was found as a modified amino acid in collagen-like silk, while it remains unclear if this amino acid functions, e.g., as glycosylation site (Sehnal and Sutherland 2008).

Furthermore, intra- and intermolecular disulfide bridges can stabilize silk structures. As an extreme example, aquatic larvae of the midge produce silk with unusual high amounts of cysteine residues (Case et al. 1997). The containing CXCXC-motif is highly conserved and probably contributes to intermolecular crosslinking of the silk. In *Bombyx mori*, an intermolecular disulfide bridge between the light- and heavy-chain of fibroin is essential for the efficient secretion of the silk (Takei et al. 1987). Additionally, several tanning reactions based on phenolic crosslinking have been observed in silk (Brunet and Coles 1974, Sutherland et al. 2012), e.g., dityrosine crosslinking in silk fibroin of *Antheraea pernyi* (Raven et al. 1971). Interestingly, unlike in marine glue systems, there are no reports about dihydroxyphenylalanine-(DOPA)-residues in insect silk so far. Finally, insect silk can contain acetylated amino acid residues as well as lysine-mediated crosslinks (Chen et al. 2010). Posttranslational modifications can also occur via glycosylation (Hoffman et al. 1996, Tanaka et al. 1999a). Due to the intrinsic hydration properties, these residues probably contribute to the elastomeric properties of silk. Even organic compounds such as flavonoids can be embedded in silk structures, but recent studies indicate that this feature is primarily a side effect of a metabolic response to dietary toxins (Xu et al. 2013).

So far, several structural elements and their impact on the material properties have been identified. This leads to the essential question of the correlation between structure and function. In other words: How necessary is the presence of certain structural elements in silk to fulfill its purpose?

The cement-like silk of the grey silverfish (*Ctenolepisma longicaudata*) is a good example for little requirements on material properties (Walker et al. 2013). Male silverfish produce the silk as a tactile cue during mating, which navigates the female during the uptake of spermatophores. The silk contains high fractions of random coil structures and only little alpha helical content. It becomes brittle after drying and exhibits a low chemical stability, but since the mating only lasts for approximately thirty minutes, it fulfills its purpose.

As a completely different example, female lacewings deposit their eggs by attaching them individually to a stalk of silk (Weisman et al. 2009). The stalk protects the egg from predators like ants. These egg stalks require a bending stiffness to withstand environmental influences over time periods of several days. Therefore, the high content of densely packed cross-beta structures found in the stalks seems to be a logical

consequence due to tight interactions between the beta strands which are aligned perpendicular to the fiber axis.

However, in general the correlation between structure and function is considered to be low, illustrated by the fact that all five types of ordered silk structure are generally used to make cocoons (Sutherland et al. 2010). It also has to be mentioned that there is a low correlation between the function of silk and the glands in which they are produced: For example, in labial glands all five known silk protein structures can be produced depending on the respective species (Sutherland et al. 2010). Importantly, several glands exist such as Malpighian tubule or dermal glands that can produce silk proteins (cf. [Table 2](#)).

Evolutionary Conservation of Silk

Silk is believed to have evolved multiple times: 23 different “silk lineages” have been proposed, as summed up in [Table 2](#) and [Fig. 2](#) (Sutherland et al. 2010). As already discussed, a crystalline structure in silk is strictly based on the primary sequence of the proteins (such as periodicity of the comprising repetitive elements). Once one type of ordered structure has been emerged, it seems very unlikely that another ordered crystalline structure can arise from it during evolution, since only a few mutations on the genetic level are able to destroy the symmetric conditions of the already existing silk type. Only collagen-like silk could theoretically arise from polyglycine structures, since both silk types have a very similar amino acid periodicity (Sutherland et al. 2010).

The degree of tolerated variety in the primary sequence may depend on the type of crystalline structure: While extended beta sheets seem to compensate occasional sequence irregularities to a certain amount (Zhou et al. 2001), cross beta structures are apparently much more determined by the regularity of their consecutive repeats. This may also be due to the fact that mutations in this silk type can cause amyloidogenic properties of the protein.

The homologous tetrameric coiled coil silk of bees and ants (Apoidea and Vespoidae) is an example of highest sequence divergence (Sutherland et al. 2007a): Here, only the character of amino acid residues, in particular heptad positions, is conserved instead of actual sequence repeats. As long as the coiled coil structure maintains, an extensive variety in the primary sequence seems to be allowed. Interestingly, ancestral species of the two mentioned superfamilies formerly produced beta-sheet silk, though it is claimed that the transition towards coiled coil silk occurred by gene duplication of a silk-unrelated gene and not by accumulated mutations within the silk genes encoding for beta-sheet structures (Sutherland et al. 2006).

Table 2. Overview of silks in the class Insecta.^{2,3} (Modified after Sutherland et al. 2010).

Common name of insect group [higher classification] (references)	Purpose of silk	Life stage/gland
A) Silk proteins predominantly in beta-sheet conformation; mRNA of dominant silk gene approximately 2 kb; partial silk sequences contain reiterating GS- or GA-repeats; silk fiber contains 4% alanine, 31% serine, 44% glycine.		
1. Jumping bristletails, silverfish [Archeognatha: families Machilidae and Meinertellidae; Zygentoma] (Sturm 1992, Grimaldi and Engel 2005)	Indirect sperm transfer, silken threads guiding the female to spermatophore, silken stalks or mats holding droplets of sperm above the ground	Adult males/Type III secretory units
2. Mayflies [Ephemeroptera: family Polymitarcyidae] (Sattler 1967)	Lining for U-shaped tunnels in submerged wood	Larvae/apparently in Malpighian tubules
3. Dragonflies [Odonata: family Gomphidae] (Gambles 1956)	Presumably anchoring eggs; bundles of fibers attached to eggs that uncoil upon exposure to water	Adult female/unknown
4. Webspinners [Embiidina] (Edgerly 1987, Okada et al. 2008)	Tunnels and egg coatings	All stages/Type III secretory units in prothoracic tarsomeres
B) Silk proteins predominantly in beta-sheet conformation; silk is used for shelters; silk fiber contains 12% alanine, 32% serine, 13% glycine.		
5. Crickets [Orthoptera: Stenopelmatoidea in the families Gryllacrididae and Anostostomatidae] (Rentz and Weissman 1973, Morton and Rentz 1983, Bland and Rentz 1991)	Binding leaves together for construction of cocoon-like nests, linings for sand burrows	All stages/labial glands
6. Book lice [Psocoptera: suborders Psocomorpha and Troctomorpha] (New 1987)	Egg coverings and nests	Adult females/labial glands

² Silks produced by animals in the class Entognatha (orders Protura, Diplura, and Collembola) are not included because of the scarcity of information on silk production in these animals.

³ The number pertaining to each insect group also refers to its respective illustration in [Fig. 2](#).

Table 2. *contd.*

Common name of insect group [higher classification] (references)	Purpose of silk	Life stage/gland
7. Thrips [Thysanoptera: Terebrantia in the families Heterothripidae and Aeolothripidae; Tubulifera, family Phlaeothripidae in the subfamily Phlaeothripinae] (Mound and Morris 2001, Izzo et al. 2002)	Cocoons or tent-like shelters for protection against predators, extreme temperatures, and low humidity	Larvae and possibly adults/secretions from the anal region, likely from Malpighian tubules
8. <i>Kahaono montana</i> Evans [Hemiptera in this single species] (Chang et al. 2006)	Protective shelters	Unknown
C) Silk proteins in a cross-beta conformation with X-ray diffraction patterns that are markedly different from the proteins in the neuropteran cross-beta-sheet silks but similar to supercontracted keratins.		
9. Water beetles [Coleoptera: family Hydrophilidae] (Rudall 1962)	Silken rafts to support eggs	Adult female/colleterial glands
D) <i>Hypera</i> species cocoon silk proteins adopt a cross-beta structure 10 amino acids in width.		
10. Plant-eating beetles [Coleoptera: Cucujiformia] (Kenchington 1983, Oberprieler et al. 2007)	Terrestrial or aquatic cocoons, silk-lined tunnels in the sand	Larvae/Malpighian tubules
E) Species in Chrysopidae and Nymphidae have silk proteins in a cross-beta structure 8 amino acids in width; silk fiber contains 20% alanine, 41% serine, 24% glycine.		
11. Lacewings [Neuroptera, found within four of the six superfamilies] (Lucas et al. 1957, Parker and Rudall 1957, Duelli 1986, Weisman et al. 2009)	Egg stalks or egg coverings	Adult females/colleterial glands

Table 6. *contd....*

Table 6. contd.

F) Cocoon of the green lacewing <i>Mallada signata</i> is composed of small (49 kDa) alpha-helical proteins and lipids; silk fiber contains 40% alanine, 7% serine, 11% glycine.		
12. Lacewings and ant lions [Neuroptera] (Rudall and Kenchington 1971, Weisman et al. 2008)	Cocoons	Larvae/Malpighian tubules
G) Silks with an extended beta-sheet structure; the phylogenetic distribution suggests that this structure is plesiomorphic to the Hymenoptera with other structures seen in this order (see below) representing derived conditions; a partial silk gene sequence (785 nucleotides) corresponding to a large (>500 kDa) cocoon protein from the parasitic wasp. <i>Cotesia glomerata</i> (Ichneumonoidea) encodes a protein containing a 28-amino-acid repeat sequence rich in consecutive DS-dipeptide repeats; silk fiber contains 36–56% alanine, 8–40% serine, 2–31% glycine.		
13. Sawflies and parasitic wasps [Hymenoptera] (Rudall and Kenchington 1971, Quicke et al. 2004, Sutherland et al. 2007a)	Cocoons, nests, and webs	Larvae/labial gland
H) Silk fibers contain four small (30–50 kDa) homologous alpha-helical proteins that adopt a tetrameric coiled-coil structure; silk fiber contains 23–34% alanine, 10–17% serine, 5–6% glycine.		
14. Parasitic wasps [Hymenoptera: Chalcidoidea in several Eupelmidae and one Signiphoridae species] (Woolley and Vet 1981)	Egg covering and host covering	Adult female/abdomen secretion
15. Bees, ants, and wasps [Hymenoptera: Apoidea and Vespoidea] (Sutherland et al. 2006, Sezutsu et al. 2007, Sutherland et al. 2007a)	Nests and cocoons	Larvae/labial gland
I) Polyglycine II structured proteins contain high levels of glycine (66%) and are present in the cocoons of some Allantinae, Heterarthrinae, and Blennocampinae species; related collagen structures are found in cocoons from the tribe Nematini (Nematinae) as well as species from the Blennocampinae and Tenthredininae; the amino acid hydroxyproline which is usually abundant in collagens is not found in silk, but hydroxylysine (3.3–4%) is; collagen silk fiber contains 28% alanine, 14% serine, 11% glycine.		
16. Sawflies [Hymenoptera: Tenthredinoidea in the family Tenthredinidae] (Rudall and Kenchington 1971)	Cocoons	Larvae/labial gland

Table 2. contd....

Table 2. *contd.*

Common name of insect group [higher classification] (references)	Purpose of silk	Life stage/gland
J) Silk fiber contains 14–20% alanine, 16–19% serine, 10–27% glycine (total 49–57%).		
17. Wasps [Hymenoptera: Apoidea in the subfamily Pemphredoninae, some species in <i>Microstigmus</i> , <i>Spilomena</i> and <i>Arpactophilus</i>] (Matthews and Starr 1984, Serrao 2005)	Rope fabricated from plant fibers and silk suspending the nest	Adult females/Type III secretory units in posterior metasoma
18. Wasps [Hymenoptera: Vespoidea in the family Vespidae; the species <i>Dolichovespula maculate</i> , <i>Polistes metricus</i> , <i>P. annularis</i> , and <i>Ropalidia opifex</i>] (Mcgovern et al. 1988, Espelie and Himmelbach 1990, Maschwitz et al. 1990)	Nests constructed from fine silk fibers binding plant fibers	Adult females/labial glands
K) Proteins in the cocoon of <i>Xenopsylla cheopis</i> are in an alpha-helical conformation; the X-ray diffraction patterns are similar to known coiled-coil structures.		
19. Fleas [Siphonaptera] (Rudall and Kenchington 1971, Silverman et al. 1981, Lawrence and Foil 2002)	Cocoons	Larvae/labial glands
L) A partial protein sequence (766 amino acids) identified from mRNA extracted from male silk glands and corresponding to a large (220 kDa) silk protein present in the silk-producing basitarsi is repetitive with high levels of aspartic acid (21.9%) and glycine (13.9%).		
20. Dance flies [Diptera: family Empididae in the subfamily Empidinae] (Young and Merritt 2003, Sutherland et al. 2007b)	Silk-wrapped nuptial gifts	Adult males/Type III secretory units in prothoracic basal tarsomeres

Table 6. *contd....*

Table 6. *contd.*

M) The threads of <i>Arachnocampa luminosa</i> contain proteins with cross-beta crystalline structure.		
21. Glowworms [Diptera: family Keroplatidae] (Rudall 1962)	Nests/prey capture threads	Larvae/labial glands
N) The silk of Chironomidae is produced from proteins (40 kDa up to very high molecular weight) containing high levels of cysteine; silk fiber contains 6% alanine, 12% serine, 10% glycine.		
22. Midges [Diptera: Chironomoidea in the families Chironomidae and Simuliidae] (Macgregor and Mackie 1967, Oliver 1971, Case et al. 1994, Kiel and Roder 2002)	Aquatic silken tubes, adhesive lifelines, cocoons	Larvae/labial gland
O) Silk consists of two filaments glued together by serine-rich (>15% serine) proteins known as sericins; the filaments consist of three proteins: heavy fibroin (>200 kDa), light fibroin (25–30 kDa), and the glycoprotein P25 (~25 kDa); around 90% of the sequence of the heavy fibroin protein of <i>Bombyx mori</i> contains consecutive GX-repeats (X = alanine, serine, or tyrosine), which form extended beta-sheet structures, interspersed with amorphous motifs; other lepidopteran silks contain homologs of these proteins; trichopteran silk contains homologs of only the heavy and light fibroin proteins; silk fiber contains 5–57% alanine, 0–22% serine, 19–48% glycine.		
23. Butterflies, moths, caddisflies [Lepidoptera, Trichoptera] (Mita et al. 1994, Tanaka et al. 1999a, Tanaka et al. 1999b, Zhou et al. 2000, Tanaka and Mizuno 2001, Yonemura and Sehnal 2006, Yonemura et al. 2006, He et al. 2012)	Cocoons (aquatic and terrestrial), tunnels, retreats, communal webs, prey capture nets	Larvae/labial gland

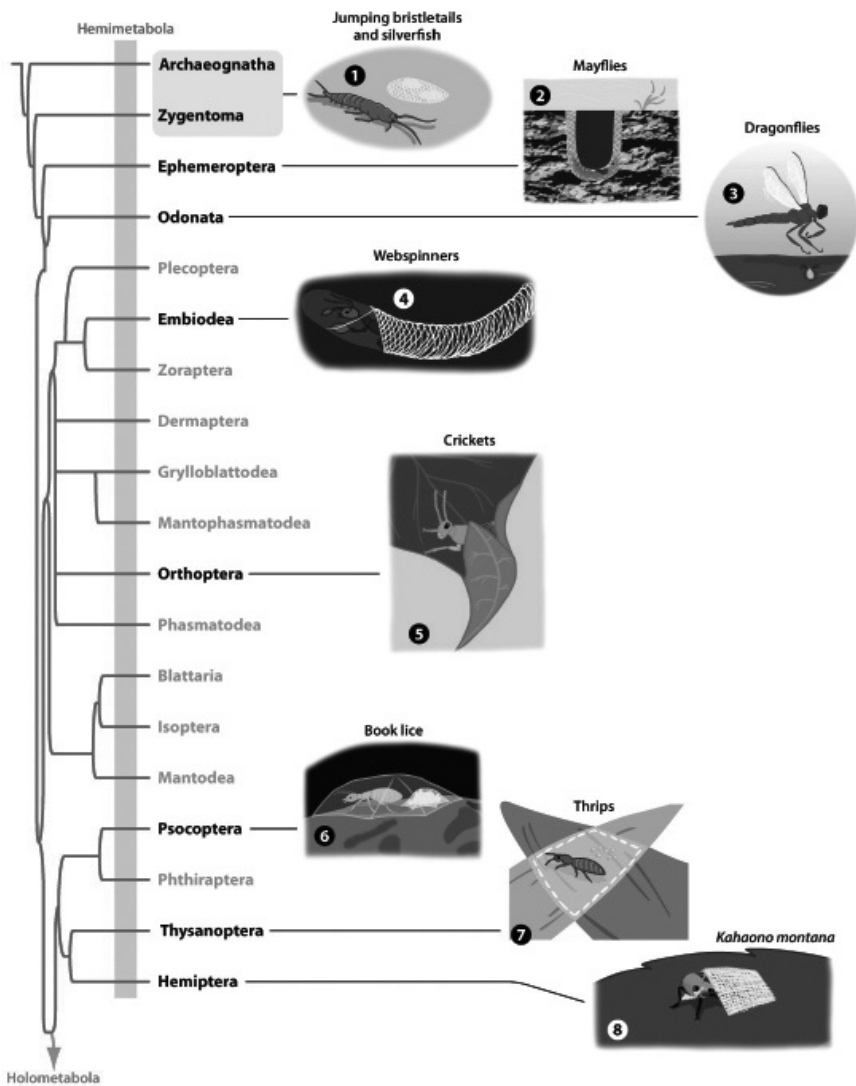
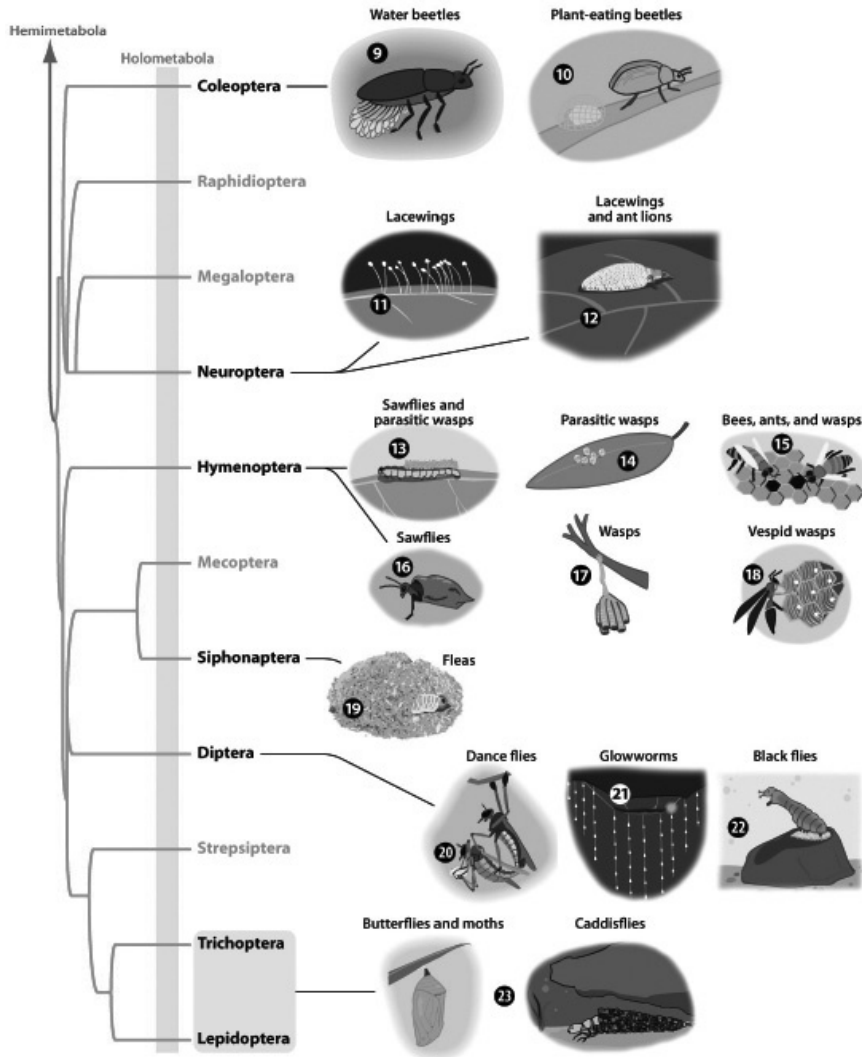


Figure 2. contd....

Figure 2. contd.



A R Sutherland TD, et al. 2010.
Annu. Rev. Entomol. 55:171–88

Figure 2. Phylogenetic relationship of all silk-producing insects (from Sutherland et al. 2010, with permission).

Color image of this figure appears in the color plate section at the end of the book.

The aspect of conservation in terminal sequences is strongly connected to their role during protein assembly (Fig. 3). The termini of silk proteins often possess a high hydrophilicity, and one of their functions is to increase the solubility of the silk proteins (Bini et al. 2004, Sutherland et al. 2007a). They also play a very important role during the processing of the soluble silk proteins towards a fiber which will be depicted later on in this chapter.

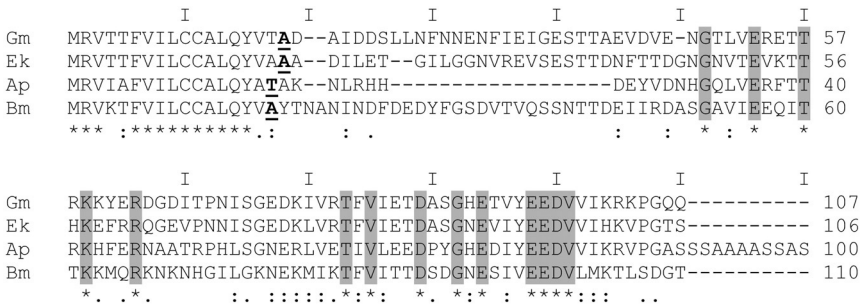


Figure 3. Alignment of heavy-chain fibroin sequences from species of Lepidoptera (Gm: *Galleria mellonella*; Ek: *Ephestia kuehniella*; Ap: *Antheraea pernyi*; Bm: *Bombyx mori*). Only the N-terminal domains are shown. The first residue after the predicted signal peptide cleavage is underlined. Conserved residues are highlighted in gray (except residues from signal sequences). Colons and periods indicate conservation between residues of highly or less similar properties, respectively. (Modified from Sehnaal and Zurovec 2004).

Summary of Silk Function

As summarized in Table 2, the primary use of insect silk is as cocoon material. Besides silk of silverfish, only the caterpillar *Yponomeuta cagnagellus* uses silk as an orientation device (Walker et al. 2013). Furthermore, silks are also used for egg covering or protective shelters. Silks are rarely used by insects for capturing prey, only by glowworms and by species within the order of Trichoptera. Only in the order of Neuroptera, species can produce two different types of silk.

Bioprocessing of Silk

The high translation rates of silk mRNA can affect the genetic level in silk glands: In many insects, e.g., dipteran species, gland cells undergo several rounds of endoreplication (DNA replication without subsequent mitosis) which results in high copies of connected sister chromatids encoding silk proteins (Botella and Edstrom 1991, Wieslander 1994). These polytene chromosomes contain sites of intensive transcription (named Balbiani rings in salivary gland cells of chironomid larvae). Since the silk of

Chironomidae is either used for protective tunnels or pupation tubes, the composition of the silk varies depending on the larval instar (Sehnal and Sutherland 2008).

Especially when silk functions as cocoon material, the regulation of silk production is strongly linked to metamorphosis (Jindra et al. 2013). Both molting and metamorphosis is controlled by a complex interaction of juvenile hormone and ecdysteroids. Juvenile hormone is synthesized in the corpora allata, the removal of this endocrine gland (allatectomy) in early penultimate-instar silkworms results in precocious metamorphosis (Sehnal and Akai 1990) (see also chapters by Orchard and Orchard, this book, Hoffmann et al., this book). This and other transplantation experiments led to the conclusion that juvenile hormone suppresses both growth and activity of silk glands (Sehnal and Akai 1990). Additionally, juvenile hormone-deficient *Bombyx mori* strains are known, which exhibit precocious metamorphosis in the third or fourth larval instar instead of the regular fifth (Daimon et al. 2012).

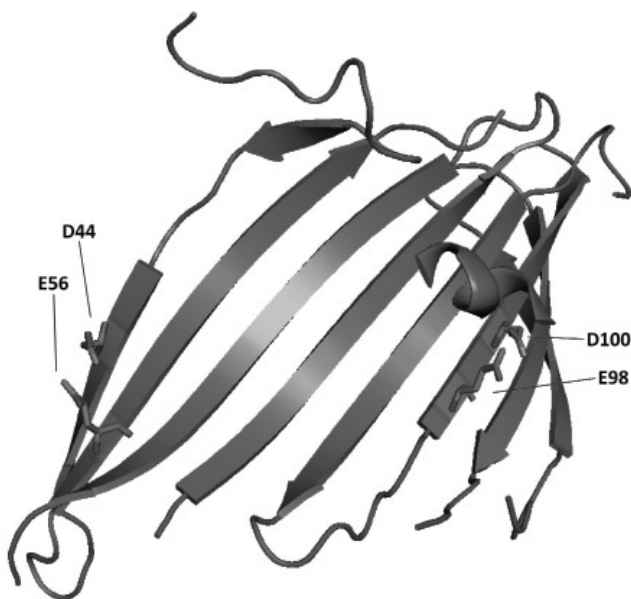


Figure 4. Position of conserved acidic residues in the structure of the heavy-chain fibroin N-terminal domain (*Bombyx mori*, pdb-file: 3UA0). One pair of acidic residues is located on the same beta strand (E98 and D100), one pair is located on two adjacent strands (D44 and E56). At neutral pH, the charge repulsion caused by these residues impedes the dimerization of N-terminal domains. (Adapted from He et al. 2012).

Color image of this figure appears in the color plate section at the end of the book.

In the silk glands of the silkworm, the natural spinning process was analyzed most extensively compared to other species (Iizuka 1985, Iizuka 1988, Matsumoto et al. 2007). After fibroin synthesis in the posterior region of the glands (approx. 0.6 mm in diameter and 200 mm in length), the protein is secreted into the lumen (Iizuka 1988). The initial protein concentration amounts 12 to 15 percent by weight, and the fibroin assembles into micelles as indicated by experiments with regenerated silk fibroin (Jin and Kaplan 2003). The aqueous solution is then extruded by peristaltic motions to the duct of the middle gland region (2 mm thick and 60 mm long), where it is concentrated for storage at 20 to 30 percent by weight (Matsumoto et al. 2007). At this concentration, the micelles presumably condense into globular structures (Jin and Kaplan 2003). In the middle region of the silk gland, sericin is secreted covering the wall of the lumen and absorbing water from the fibroin (Iizuka 1988, Jin and Kaplan 2003). In the lumen of the anterior glands (35 mm in length and narrowing toward the end to 50 μm in diameter), the pH drops from near neutral to 4.9 at the point of spinning and the salt concentration increases (Matsumoto et al. 2007, He et al. 2012). The final spinning process into water-insoluble fibers occurs by shear forces applied by the spinneret. The transition towards a solid state emerges out of a lyotropic liquid crystal phase which enables a relatively low flow viscosity and allows uniform molecular alignment to a preexisting molecular orientation (Kerkam et al. 1991, Jin and Kaplan 2003). The sericin envelopes the fibroin fibrils and may also promote the elasticity of the spun fiber and function as a donor for divalent cations (Matsumoto et al. 2007).

Recent studies revealed the role of the terminal domains of silk fibroin during fiber assembly (He et al. 2012). In the N-terminal domain of the fibroin heavy chain, random coil is the predominant structural element at neutral pH. Additionally, acidic residues of the domain impede the formation of homodimers by charge repulsion (Fig. 4). During the decrease of pH in the anterior gland, these residues get protonated, and along with emerging beta-sheets a dimer entanglement is enabled. The respective acidic residues which prevent premature beta sheet formation at neutral pH are conserved throughout the orders of Lepidoptera and Trichoptera (Sehnal and Zurovec 2004, Yonemura et al. 2009, Fig. 3). As an intriguing fact, the same mechanism of pH-induced dimerization by acidic residues is also involved in spidroin assembly of spider silk, though both silk proteins have been evolved independently, and the spider silk domains stay alpha-helical throughout the entire process (Eisoldt et al. 2012). This is a fascinating example of convergent evolution on a molecular level (He et al. 2012).

The spinning speed of silkworms ranges from 0.4 to 1.5 cm/sec, the critical shear rate has been estimated to be from 100 to 1000 sec^{-1} (Iizuka

1988). Artificial reeling of silkworm silk under steady conditions results in shifted mechanical properties towards increasing either strength or extensibility, indicating the crucial role of spinning conditions on the mechanical properties of the resulting silk (Shao and Vollrath 2002).

In the order of Trichoptera, the morphological alignment of silk proteins is similar to the one described for silkworm silk (Engster 1976, Ashton et al. 2012). The peripheral protein layer consists of a glycoprotein, but the layer is much thinner than in silkworm silk, and structural similarities to silk sericin remain unclear so far (Engster 1976). Additionally, the protein P25 which ensures the solubility of the silkworm fibroin during the processing is absent in silk of caddisflies (Inoue et al. 2000, Yonemura et al. 2009).

In the order of Hymenoptera, the concentrated silk dope is organized in two possible ways within the gland lumen: The protein molecules can either be organized into spindle-shaped tactoids with a length up to 40 μm or they can form fibrous bars (Flower and Kenchington 1967). Tactoids were observed in silk glands of honey bees and ants, whereas in bumble bees and colonial wasps the proteins are mainly arranged into fibrous bars (Gomes et al. 2004, Sutherland et al. 2012). As in the silk gland of *Bombyx mori*, the macromolecular arrangement in the order of Hymenoptera lowers the flow viscosity of the silk dope when it passes through the spinneret.

Biomedical and Technical Applications of Insect Silk

The knowledge on natural silk processing is the premise for a biotechnological approach of silk production (Jin and Kaplan 2003). In this context, in analogy to the biomimetic principle of extracting the “key idea” of a biological concept, various types of natural silk have been mimicked by a modular design (Huang et al. 2003, Scheibel 2004). Briefly, consensus sequences were defined based on repetitive motifs of natural silk proteins. Genes encoding for the consensus motifs were multimerized to a desired length, and the artificial silk protein can be produced in host organisms like *Escherichia coli* (Heidebrecht and Scheibel 2013).

After purification of the silk proteins, several methods of artificial fiber formation have been reported: Fibers can be produced by wet-spinning in a coagulation bath (Matsumoto et al. 1996) or by electrospinning, where the solvent evaporates in an electric field (Jin et al. 2002). The last mentioned method can result in non-woven scaffolds depending on the method of fiber collection. Additionally, artificial silk proteins can generally be processed into films, foams, hydrogels, particles or capsules (Mori and Tsukada 2000, Spiess et al. 2010).

Unlike spider silk, the manufacturing process of silkworm silk is well established since ancient times. For distinct applications, the usage of reconstituted silk fibroin out of natural cocoons is often a cost-efficient method instead of the biotechnological production described above. However, since sericin is the major cause for an impaired biocompatibility, additional processing methods are required to make silkworm silk suitable especially for biomedical applications (Altman et al. 2003). In general, sericin can be removed by boiling of silkworm silk fibers in aqueous solutions (Jin and Kaplan 2003). Subsequent coating with waxes or silicone reduces frying and results in frequently used suture materials (Altman et al. 2003).

Especially silk scaffolds exhibit beneficial properties for tissue engineering: Mechanical integrity makes silk scaffolds suitable for engineering of, e.g., bone or ligament tissue (Altman et al. 2003). Due to its slow proteolytic degradation, silk fibers can retain their initial tensile strength for the duration of tissue development (Altman et al. 2003). Thus, in several studies the potential of silk scaffolds for regenerating tendons, ligaments and skin tissue has been evaluated (Mori and Tsukada 2000, Kundu et al. 2013). Furthermore, a promising application is the use as a scaffolding material for injuries of the peripheral nervous system: Conduits comprising silkworm silk are able to bridge nerve gaps up to 13 mm (Huang et al. 2012).

Silk particles and films are widely tested as drug delivery systems (Hardy et al. 2013, Kundu et al. 2013). For example, particles of defined size and surface charge can be noncovalently loaded with a drug of opposite charge. After endocytosis by a cell, the silk particles often accumulate in the lysosomes (Duncan and Richardson 2012). The drug release can be controlled by a stimulus-responsive silk polymer: For example, proteolysis of silk particles ensures a drug release specifically in the slightly acidic environment of lysosomes (Seib et al. 2013). If the uptake of the drug particles is controlled by additional signaling pathways, e.g., by decorating them with cell surface receptor-specific ligands such as the peptide RGD, the modified drug delivery system allows to increase its specificity.

In general, chemical modifications can enhance, e.g., cell proliferation or cell adhesion (Altman et al. 2003). Post-treatment of artificially processed silk with organic solvents can alter the proportions of the scaffold's secondary structures; e.g., methanol induces beta-sheet formation, resulting in water insensitive silk materials (Wilson et al. 2000). Introducing the peptide motif RGD can enhance cell adhesion on the respective silk scaffold (Hardy et al. 2013).

Beyond biomedical applications, there are several approaches towards technical utilizations of the unique silk properties. Due to proportions

of densely packed crystalline structures, many silks already exhibit a chemical and thermal stability satisfying most common textile demands. Functionalization of silk can introduce additional properties such as water repellency, thermal stability or antibacterial properties (Li et al. 2012, Fei et al. 2013). Furthermore, the exceptional bending stiffness inherent in lacewing egg stalks could be utilized for filter materials where resistance against lateral forces is required. Compared to synthetic filter materials, much less amounts of silk are needed for an equivalent filter performance (Lang et al. 2013).

In conclusion, insect silk represents a material which is produced by a vast number of species. The mechanical properties of silks are highly adapted to both functional requirements and environmental conditions in which they are produced. Besides unique material performance, silk exhibits non-toxic, biocompatible and biodegradable properties and can therefore be used for versatile biomedical and technical applications.

Acknowledgement

Funding was derived from StMUV (U8793-2012/6-2).

Keywords: insect silk, protein fiber, protein assembly, biomaterial, biotechnology

References

- Altman, G.H., F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R.L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond and D.L. Kaplan. 2003. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24: 401–416.
- Ashton, N.N., D.S. Taggart and R.J. Stewart. 2012. Silk tape nanostructure and silk gland anatomy of trichoptera. *Biopolymers* 97: 432–445.
- Ashton, N.N., D.R. Roe, R.B. Weiss, T.E. Cheatham 3rd and R.J. Stewart. 2013. Self-tensioning aquatic caddisfly silk: ca (2+)-dependent structure, strength, and load cycle hysteresis. *Biomacromolecules* 14: 3668–3681.
- Bini, E., D.P. Knight and D.L. Kaplan. 2004. Mapping domain structures in silks from insects and spiders related to protein assembly. *J. Mol. Biol.* 335: 27–40.
- Bland, R.G. and D.C.F. Rentz. 1991. External morphology and abundance of mouthpart sensilla in Australian Gryllacrididae, Stenopelmatidae, and Tettigoniidae. *J. Morphol.* 207: 315–325.
- Botella, L.M. and J.E. Edstrom. 1991. The Balbiani ring 6 induction in *Chironomus*. *Eur. Cell Biol. Org.* 71: 11–16.
- Brunet, P.C. and B.C. Coles. 1974. Tanned silks. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 187: 133–170.
- Case, S.T., J. Powers, R. Hamilton and M.J. Burton. 1994. Silk and silk proteins from 2 aquatic insects. *Silk Polym.* 544: 80–90.
- Case, S.T., C. Cox, W.C. Bell, R.T. Hoffman, J. Martin and R. Hamilton. 1997. Extraordinary conservation of cysteines among homologous *Chironomus* silk proteins sp185 and sp220. *J. Mol. Evol.* 44: 452–462.
- Chang, J.C., G.M. Gurr, M.J. Fletcher and R.G. Gilbert. 2006. Structure-property and structure-function relations of leafhopper (*Kahaono montana*) silk. *Austral. J. Chem.* 59: 579–585.

- Chen, W.Q., H. Priewalder, J.P. John and G. Lubec. 2010. Silk cocoon of *Bombyx mori*: proteins and posttranslational modifications—heavy phosphorylation and evidence for lysine-mediated cross links. *Proteomics* 10: 369–379.
- Craig, C.L. 1997. Evolution of arthropod silks. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 231–267.
- Crick, F.H. and A. Rich. 1955. Structure of polyglycine II. *Nature* 176: 780–781.
- Daimon, T., T. Kozaki, R. Niwa, I. Kobayashi, K. Furuta, T. Namiki, K. Uchino, Y. Banno, S. Katsuma, T. Tamura, K. Mita, H. Sezutsu, M. Nakayama, K. Itoyama, T. Shimada and T. Shinoda. 2012. Precocious metamorphosis in the juvenile hormone-deficient mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS Gen.* 8: e1002486.
- Dicko, C., D. Porter, J. Bond, J.M. Kenney and F. Vollrath. 2008. Structural disorder in silk proteins reveals the emergence of elastomerity. *Biomacromolecules* 9: 216–221.
- Duelli, P. 1986. A missing link in the evolution of the egg pedicel in lacewings. *Experientia* 42: 624–624.
- Duncan, R. and S.C.W. Richardson. 2012. Endocytosis and intracellular trafficking as gateways for nanomedicine delivery: opportunities and challenges. *Mol. Pharmac.* 9: 2380–2402.
- Edgerly, J.S. 1987. Maternal-behavior of a webspinner (Order Embiidina). *Ecol. Entomol.* 12: 1–11.
- Eisoldt, L., C. Thamm and T. Scheibel. 2012. Review the role of terminal domains during storage and assembly of spider silk proteins. *Biopolymers* 97: 355–361.
- Engster, M.S. 1976. Studies on silk secretion in the Trichoptera (F. Limmephilidae). II. Structure and amino acid composition of the silk. *Cell Tiss. Res.* 169: 77–92.
- Espelie, K.E. and D.S. Himmelsbach. 1990. Characterization of pedicel, paper, and larval silk from nest of *Polistes annularis* (L.). *J. Chem. Ecol.* 16: 3467–3477.
- Fei, X., M. Jia, X. Du, Y. Yang, R. Zhang, Z. Shao, X. Zhao and X. Chen. 2013. Green synthesis of silk fibroin-silver nanoparticle composites with effective antibacterial and biofilm-disrupting properties. *Biomacromolecules* 14: 4483–4488.
- Flower, N.E. and W. Kenchington. 1967. Studies on insect fibrous proteins: the larval silk of *Apis*, *Bombus* and *Vespa* (Hymenoptera: Aculeata). *J. Roy. Microscop. Soc.* 86: 297–310.
- Gambles, R.M. 1956. Eggs of *Lestiniogomphus africanus* (Fraser). *Nature* 177: 663–663.
- Gomes, G., E.C. Silva-Zacarin, F.J. Zara, R.L. Silva de Moraes and F.H. Caetano. 2004. Macromolecular array patterns of silk gland secretion in social Hymenoptera larvae. *Gen. Mol. Res.* 3: 309–322.
- Greving, I., M. Cai, F. Vollrath and H.C. Schniepp. 2012. Shear-induced self-assembly of native silk proteins into fibrils studied by atomic force microscopy. *Biomacromolecules* 13: 676–682.
- Grimaldi, D.A. and M.S. Engel. 2005. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press, Cambridge, New York. 755 pp.
- Hardy, J.G., Leal-Egana and T.R. Scheibel. 2013. Engineered spider silk protein-based composites for drug delivery. *Macromol. Biosci.* 13: 1431–1437.
- He, Y.X., N.N. Zhang, W.F. Li, N. Jia, B.Y. Chen, K. Zhou, J. Zhang, Y. Chen and C.Z. Zhou. 2012. N-Terminal domain of *Bombyx mori* fibroin mediates the assembly of silk in response to pH decrease. *J. Mol. Biol.* 418: 197–207.
- Heidebrecht, A. and T. Scheibel. 2013. Recombinant production of spider silk proteins. *Adv. Appl. Microbiol.* 82: 115–153.
- Heim, M., L. Romer and T. Scheibel. 2010. Hierarchical structures made of proteins. The complex architecture of spider webs and their constituent silk proteins. *Chem. Soc. Rev.* 39: 156–164.
- Hepburn, H.R., H.D. Chandler and M.R. Davidoff. 1979. Extensometric properties of insect fibroins—green lacewing cross-beta, honeybee alpha-helical and greater waxmoth parallel-beta conformations. *Insect Biochem.* 9: 69–77.
- Hoffman, R.T., E.R. Schmidt and S.T. Case. 1996. A cell-specific glycosylated silk protein from *Chironomus thummi* salivary glands. Cloning, chromosomal localization, and characterization of cDNA. *J. Biol. Chem.* 271: 9809–9815.

- Huang, J., R. Valluzzi, E. Bini, B. Vernaglia and D.L. Kaplan. 2003. Cloning, expression, and assembly of sericin-like protein. *J. Biol. Chem.* 278: 46117–46123.
- Huang, W., R. Begum, T. Barber, V. Ibba, N.C. Tee, M. Hussain, M. Arastoo, Q. Yang, L.G. Robson, S. Lesage, T. Gheysens, N.J. Skaer, D.P. Knight and J.V. Priestley. 2012. Regenerative potential of silk conduits in repair of peripheral nerve injury in adult rats. *Biomaterials* 33: 59–71.
- Hutchinson, E.G. and J.M. Thornton. 1994. A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins. *Protein Sci.* 3: 2207–2216.
- Iizuka, E. 1985. Silk thread—mechanism of spinning and its mechanical-properties. *Appl. Polymer Symp.* 41: 173–185.
- Iizuka, E. 1988. Properties of the liquid crystals of some biopolymers. *Adv. Biophysics* 24: 1–56.
- Inoue, S., K. Tanaka, F. Arisaka, S. Kimura, K. Ohtomo and S. Mizuno. 2000. Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6 : 6 : 1 molar ratio. *J. Biol. Chem.* 275: 40517–40528.
- Izzo, T.J., S.M.J. Pinent and L.A. Mound. 2002. *Aulacothrips dictyotus* (Heterothripidae), the first ectoparasitic thrips (Thysanoptera). *Florida Entomol.* 85: 281–283.
- Jahn, T.R., O.S. Makin, K.L. Morris, K.E. Marshall, P. Tian, P. Sikorski and L.C. Serpell. 2010. The common architecture of cross-beta amyloid. *J. Mol. Biol.* 395: 717–727.
- Jin, H.J., S.V. Fridrikh, G.C. Rutledge and D.L. Kaplan. 2002. Electrospinning *Bombyx mori* silk with poly (ethylene oxide). *Biomacromolecules* 3: 1233–1239.
- Jin, H.J. and D.L. Kaplan. 2003. Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature* 424: 1057–1061.
- Jindra, M., S.R. Palli and L.M. Riddiford. 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. *Annu. Rev. Entomol.* 58: 181–204.
- Kenchington, W. 1983. The larval silk of *Hypera* spp. (Coleoptera, Curculionidae)—a new example of the cross-beta protein conformation in an insect silk. *J. Insect Physiol.* 29: 355–361.
- Kerkam, K., C. Viney, D. Kaplan and S. Lombardi. 1991. Liquid crystallinity of natural silk secretions. *Nature* 349: 596–598.
- Kiel, E. and T. Roder. 2002. Gelelectrophoretic studies on labial gland secretions of immature blackflies (Simuliidae, Diptera). *Limnologica* 32: 201–205.
- Kronenberger, K., C. Dicko and F. Vollrath. 2012. A novel marine silk. *Naturwissenschaften* 99: 3–10.
- Kundu, B., R. Rajkhowa, S.C. Kundu and X. Wang. 2013. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65: 457–470.
- Lang, G., S. Jokisch and T. Scheibel. 2013. Air filter devices including nonwoven meshes of electrospun recombinant spider silk proteins. *J. Visual. Exp.* 75: e50492.
- Lawrence, W. and L.D. Foil. 2002. The effects of diet upon pupal development and cocoon formation by the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). *J. Vector Ecol.* 27: 39–43.
- Li, G.H., H. Liu, T.D. Li and J.Y. Wang. 2012. Surface modification and functionalization of silk fibroin fibers/fabric toward high performance applications. *Mat. Sci. Engin. C-Mat. Biol. Appl.* 32: 627–636.
- Liu, Y., A. Spöner, D. Porter and F. Vollrath. 2008. Proline and processing of spider silks. *Biomacromolecules* 9: 116–121.
- Lucas, F., J.T.B. Shaw and S.G. Smith. 1957. Amino-acid composition of the silk of *Chrysopa* egg-stalks. *Nature* 179: 906–907.
- Macgregor, H.C. and J.B. Mackie. 1967. Fine structure of the cytoplasm in salivary glands of *Simulium*. *J. Cell Sci.* 2: 137–144.
- Maschwitz, U., W.H.O. Dorow and T. Botz. 1990. Chemical-composition of the nest walls, and nesting-behavior, of *Ropalidia- (Icariaelia)-opifex* Vandervecht, 1962 (Hymenoptera, Vespidae), a Southeast-Asian social wasp with translucent nests. *J. Nat. Hist.* 24: 1311–1319.

- Matsumoto, A., H. Kim, I. Tsai, X. Wang, P. Cebe and D. Kaplan. 2007. Silk. pp. pp. 383–404. In: M. Lewin (ed.). Handbook of Fiber Chemistry, 3rd Edit. CRC/Taylor & Francis, Boca Raton.
- Matsumoto, K., H. Uejima, T. Iwasaki, Y. Sano and H. Sumino. 1996. Studies on regenerated protein fibers. 3. Production of regenerated silk fibroin fiber by the self-dialyzing wet spinning method. *J. Appl. Polymer Sci.* 60: 503–511.
- Matthews, R.W. and C.K. Starr. 1984. *Microstigmus comes* wasps have a method of nest construction unique among social insects. *Biotropica* 16: 55–58.
- Mcgovern, J.N., R.L. Jeanne and M.J. Effland. 1988. The nature of wasp nest paper. *Tappi J.* 71: 133–139.
- Mita, K., S. Ichimura and T.C. James. 1994. Highly repetitive structure and its organization of the silk fibroin gene. *J. Mol. Evol.* 38: 583–592.
- Mori, H. and M. Tsukada. 2000. New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials. *J. Biotechnol.* 74: 95–103.
- Morton, S.R. and D.C.F. Rentz. 1983. Ecology and taxonomy of fossorial, granivorous gryllacridids (Orthoptera, Gryllacrididae) from arid Central Australia. *Austral. J. Zool.* 31: 557–579.
- Mound, L.A. and D.C. Morris. 2001. Domicile constructing phlaeothripine Thysanoptera from *Acacia phyllodes* in Australia: *Dunatothrips moulton* and *Sartrithrips* gen. n., with a key to associated genera. *Syst. Entomol.* 26: 401–419.
- New, T.R. 1987. Biology of the Psocoptera. *Oriental Insects* 21: 1–109.
- Oberprieler, R.G., A.E. Marvaldi and R.S. Anderson. 2007. Weevils, weevils, weevils everywhere. *Zootaxa* 1668: 491–520.
- Okada, S., S. Weisman, H.E. Trueman, S.T. Mudie, V.S. Haritos and T.D. Sutherland. 2008. An Australian webspinner species makes the finest known insect silk fibers. *Int. J. Biol. Macromol.* 43(3): 271–275.
- Oliver, D.R. 1971. Life history of Chironomidae. *Annu. Rev. Entomol.* 16: 211–230.
- Omenetto, F.G. and D.L. Kaplan. 2010. New opportunities for an ancient material. *Science* 329: 528–531.
- Parker, K.D. and K.M. Rudall. 1957. Structure of the silk of *Chrysopa* egg-stalks. *Nature* 179: 905–906.
- Porter, D. and F. Vollrath. 2008. The role of kinetics of water and amide bonding in protein stability. *Soft Matt.* 4: 328–336.
- Porter, D. and F. Vollrath. 2009. Silk as a biomimetic ideal for structural polymers. *Adv. Mater.* 21: 487–492.
- Quicke, D.L.J., M.R. Shaw, M. Takahashi and B. Yanechin. 2004. Cocoon silk chemistry of non-cyclostome Braconidae, with remarks on phylogenetic relationships within the Microgastrinae (Hymenoptera: Braconidae). *J. Nat. Hist.* 38: 2167–2181.
- Rauscher, S., S. Baud, M. Miao, F.W. Keeley and R. Pomes. 2006. Proline and glycine control protein self-organization into elastomeric or amyloid fibrils. *Structure* 14: 1667–1676.
- Raven, D.J., C. Earland and M. Little. 1971. Occurrence of dityrosine in Tussah silk fibroin and keratin. *Biochim. Biophys. Acta* 251: 96–99.
- Rentz, D.C. and D.B. Weissman. 1973. Origins and affinities of Orthoptera of Channel-Islands and adjacent mainland California .1. Genus *Cnemotettix*. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philad.* 125: 89–120.
- Rudall, K.M. 1962. Silk and other cocoon proteins. *Comp. Biochem.* IV: 397–433.
- Rudall, K.M. and W. Kenchington. 1971. Arthropod silks—problem of fibrous proteins in animal tissues. *Annu. Rev. Entomol.* 16: 73–96.
- Sattler, W. 1967. Über die Lebensweise, insbesondere das Bauverhalten, neotropischer Eintagsfliegen-Larven (Ephemeroptera: Polymitarcidae). *Beitr. Neotrop. Fauna* 5: 89–110.
- Scheibel, T. 2004. Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microbiol. Cell Fact.* 3: 14.

- Sehnal, F. and H. Akai. 1990. Insect silk glands—their types, development and function, and effects of environmental factors and morphogenetic hormones on them. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 19: 79–132.
- Sehnal, F. and T. Sutherland. 2008. Silks produced by insect labial glands. *Prion* 2: 145–153.
- Sehnal, F. and M. Zurovec. 2004. Construction of silk fiber core in lepidoptera. *Biomacromolecules* 5: 666–674.
- Seib, F.P., G.T. Jones, J. Rnjak-Kovacina, Y. Lin and D.L. Kaplan. 2013. pH-dependent anticancer drug release from silk nanoparticles. *Adv. Healthcare Mater.* 2: 1606–1611.
- Serrao, J.E. 2005. Ultrastructure of the silk glands in three adult females of sphecoid wasps of the genus *Microstigmus* (Hymenoptera: Pemphredoninae). *Rev. Chil. Hist. Nat.* 78: 15–21.
- Sezutsu, H., H. Kajiura, K. Kojima, K. Mita, T. Tamura, Y. Tamada and T. Kameda. 2007. Identification of four major hornet silk genes with a complex of alanine-rich and serine-rich sequences in *Vespa similimaxanthoptera* Cameron. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 2725–2734.
- Shao, Z. and F. Vollrath. 2002. Surprising strength of silkworm silk. *Nature* 418: 741.
- Silverman, H.G. and F.F. Roberto. 2007. Understanding marine mussel adhesion. *Mar. Biotechnol.* 9: 661–681.
- Silverman, J., M.K. Rust and D.A. Reiersen. 1981. Influence of temperature and humidity on survival and development of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *J. Med. Entomol.* 18: 78–83.
- Smith, C.K. and L. Regan. 1995. Guidelines for protein design: the energetics of beta sheet side chain interactions. *Science* 270: 980–982.
- Spieß, K., A. Lammel and T. Scheibel. 2010. Recombinant spider silk proteins for applications in biomaterials. *Macromol. Biosci.* 10: 998–1007.
- Stewart, R.J. and C.S. Wang. 2010. Adaptation of caddisfly larval silks to aquatic habitats by phosphorylation of h-fibroin serines. *Biomacromolecules* 11: 969–974.
- Stewart, R.J., C.S. Wang and H. Shao. 2011. Complex coacervates as a foundation for synthetic underwater adhesives. *Adv. Coll. Interf. Sci.* 167: 85–93.
- Sturm, H. 1992. Mating-behavior and sexual dimorphism in *Promesomachilis hispanica* Silvestri, 1923 (Machilidae, Archaeognatha, Insecta). *Zool. Anz.* 228: 60–73.
- Sutherland, T.D., P.M. Campbell, S. Weisman, H.E. Trueman, A. Sriskantha, W.J. Wanjura and V.S. Haritos. 2006. A highly divergent gene cluster in honey bees encodes a novel silk family. *Genome Res.* 16: 1414–1421.
- Sutherland, T.D., S. Weisman, H.E. Trueman, A. Sriskantha, J.W. Trueman and V.S. Haritos. 2007a. Conservation of essential design features in coiled coil silks. *Mol. Biol. Evol.* 24: 2424–2432.
- Sutherland, T.D., J.H. Young, A. Sriskantha, S. Weisman, S. Okada and V.S. Haritos. 2007b. An independently evolved Dipteran silk with features common to Lepidopteran silks. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37: 1036–1043.
- Sutherland, T.D., J.H. Young, S. Weisman, C.Y. Hayashi and D.J. Merritt. 2010. Insect silk: one name, many materials. *Annu. Rev. Entomol.* 55: 171–188.
- Sutherland, T.D., S. Weisman, A.A. Walker and S.T. Mudie. 2012. The coiled coil silk of bees, ants, and hornets. *Biopolymers* 97: 446–454.
- Sutherland, T.D., Y.Y. Peng, H.E. Trueman, S. Weisman, S. Okada, A.A. Walker, A. Sriskantha, J.F. White, M.G. Huson, J.A. Werkmeister, V. Glattauer, V. Stoichevska, S.T. Mudie, V.S. Haritos and J.A.M. Ramshaw. 2013. A new class of animal collagen masquerading as an insect silk. *Sci. Reports* 3: 2864.
- Takei, F., Y. Kikuchi, A. Kikuchi, S. Mizuno and K. Shimura. 1987. Further evidence for importance of the subunit combination of silk fibroin in its efficient secretion from the posterior silk gland-cells. *J. Cell Biol.* 105: 175–180.
- Tanaka, K., S. Inoue and S. Mizuno. 1999a. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 269–276.

- Tanaka, K., N. Kajiyama, K. Ishikura, S. Waga, A. Kikuchi, K. Ohtomo, T. Takagi and S. Mizuno. 1999b. Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta* 1432: 92–103.
- Tanaka, K. and S. Mizuno. 2001. Homologues of fibroin L-chain and P25 of *Bombyx mori* are present in *Dendrolimus spectabilis* and *Papilio xuthus* but not detectable in *Antheraea yamamai*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 665–677.
- Vepari, C. and D.L. Kaplan. 2007. Silk as a biomaterial. *Progr. Polymer Sci.* 32: 991–1007.
- Waite, J.H. 2002. Adhesion a la moule. *Integr. Comp. Biol.* 42: 1172–1180.
- Walker, A.A., J.S. Church, A.L. Woodhead and T.D. Sutherland. 2013. Silverfish silk is formed by entanglement of randomly coiled protein chains. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43: 572–579.
- Weisman, S., H.E. Trueman, S.T. Mudie, J.S. Church, T.D. Sutherland and V.S. Haritos. 2008. An unlikely silk: the composite material of green lacewing cocoons. *Biomacromolecules* 9: 3065–3069.
- Weisman, S., S. Okada, S.T. Mudie, M.G. Huson, H.E. Trueman, A. Sriskantha, V.S. Haritos and T.D. Sutherland. 2009. Fifty years later: the sequence, structure and function of lacewing cross-beta silk. *J. Struct. Biol.* 168: 467–475.
- Wieslander, L. 1994. The Balbiani ring multigene family: coding repetitive sequences and evolution of a tissue-specific cell function. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 48: 275–313.
- Wilson, D., R. Valluzzi and D. Kaplan. 2000. Conformational transitions in model silk peptides. *Biophys. J.* 78: 2690–2701.
- Woolley, J. and L. Vet. 1981. Postovipositional web-spinning behaviour in a hyperparasite, *Signiphora coquillei* Ashmead (Hymenoptera: Signiphoridae). *Neth. J. Zool.* 31: 627–33.
- Xu, X., M. Wang, Y. Wang, Y. Sima, D. Zhang, J. Li, W. Yin and S. Xu. 2013. Green cocoons in silkworm *Bombyx mori* resulting from the quercetin 5-O-glucosyltransferase of UGT86, is an evolved response to dietary toxins. *Mol. Biol. Reports* 40: 3631–3639.
- Yonemura, N. and F. Sehnal. 2006. The design of silk fiber composition in moths has been conserved for more than 150 million years. *J. Mol. Evol.* 63: 42–53.
- Yonemura, N., F. Sehnal, K. Mita and T. Tamura. 2006. Protein composition of silk filaments spun under water by caddisfly larvae. *Biomacromolecules* 7: 3370–3378.
- Yonemura, N., K. Mita, T. Tamura and F. Sehnal 2009. Conservation of silk genes in Trichoptera and Lepidoptera. *J. Mol. Evol.* 68: 641–653.
- Young, J.H. and D.J. Merritt. 2003. The ultrastructure and function of the silk-producing basitarsus in the Hilarini (Diptera: Empididae). *Arthr. Struct. Dev.* 32: 157–165.
- Yukuhiro, K., T. Kanda and T. Tamura. 1997. Preferential codon usage and two types of repetitive motifs in the fibroin gene of the Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *Insect Mol. Biol.* 6: 89–95.
- Zhou, C.Z., F. Confalonieri, N. Medina, Y. Zivanovic, C. Esnault, T. Yang, M. Jacquet, J. Janin, M. Duguet, R. Perasso and Z.G. Li. 2000. Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Res.* 28: 2413–2419.
- Zhou, C.Z., F. Confalonieri, M. Jacquet, R. Perasso, Z.G. Li and J. Janin. 2001. Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins-Struct. Funct. Gen.* 44: 119–122.

Danksagung

Ein besonderer Dank geht an meinen Betreuer Prof. Thomas Scheibel für sein Vertrauen, dass ich dieses spannende Projekt bearbeiten durfte. Die dabei gewährten umfangreichen wissenschaftlichen Freiheiten stellten eine große Bereicherung für mich dar. Ich bin dankbar für die vielen Erfahrungen, die ich auf diesem Wege innerhalb der vergangenen Jahre sammeln konnte.

Ein großes Dankeschön geht an die Mitglieder des Lehrstuhls Biomaterialien, die für eine kollegiale Atmosphäre gesorgt haben: Danke an meine Bürokollegen Adrian, Elena und Eileen für die vielen bereichernden Gespräche, Impulse und humorvollen Momente. Gemeinsam mit Christian, Heike, Tamara, Kristin, Andreas, Johannes, Eva, Martin, Elise, Jia, Christopher und Joschka war der Laboralltag geprägt von Hilfsbereitschaft und Kurzweil. Insbesondere Martin, Heike und Johannes danke ich für ihre Bereitschaft und Geduld, mir auch teilweise sehr kurzfristig bezüglich Primerbestellungen, Sequenzierungen bzw. Fermentationen behilflich zu sein. Angesichts der Häufigkeit dieser in Anspruch genommenen Hilfe stellt dies alles andere als eine Selbstverständlichkeit dar. Michael und Felix danke ich für ihre große Hilfe während meiner Einarbeitungsphase.

Danke an Johannes, Eva, Andreas, Alexandra und Claudia, die mit ihrer Hilfsbereitschaft maßgeblich dazu beigetragen haben, dass der alltägliche Laborbetrieb nicht ins Stocken geriet. Ihre Arbeit hat mich in meinem praktischen Arbeiten erheblich unterstützt. Danke außerdem an alle Mitglieder des Lehrstuhls, die mit mir die Freude an Fußball, Boxen und Freizeitausflügen teilten und somit auch dazu beigetragen haben, dass ich gerne ein Teil des „Team Fiberlab“ war.

And last but certainly not least, gilt mein Dank meiner Familie, die mich durch Fortschritte und Rückschläge begleitet hat. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mit ihrer Unterstützung erst den Weg zu dieser Doktorarbeit geebnet haben.

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 9 Satz 2 Nr. 4 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 9 Satz 2 Nr. 7 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 9 Satz 2 Nr. 8 PromO BayNAT)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

.....
Ort, Datum, Unterschrift